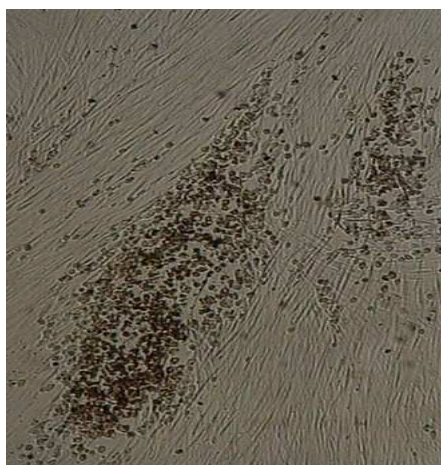


# Contributo para o estudo da infecção congénita pelo vírus citomegálico em Portugal

Paulo Jorge Pereira Cruz Paixão



Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor em  
Medicina/Microbiologia pela Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Lisboa, 2009

# Contributo para o estudo da infecção congénita pelo vírus citomegálico em Portugal

Paulo Jorge Pereira Cruz Paixão

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Doutora Teresa Marques

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor em  
Medicina/Microbiologia pela Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Lisboa, 2009

Dedico esta dissertação a Julieta da Silva Pereira (1927-2008)

Aos meus pais, porque nunca duvidaram de mim.

Ao Pedro, à Maga, à Mafalda e ao Miguel, pelo orgulho único de ser pai.

À Ju, por tudo o que trouxe à minha vida.

## **Agradecimentos**

Escrever uma dissertação para doutoramento poderá ser uma missão predominantemente solitária, mas o trabalho anterior que possibilita esse passo nunca o é, dependendo em maior ou menor grau das pessoas com quem trabalhamos, directamente ou indirectamente, mas também com quem interagimos nas esferas familiar e mesmo social.

Para todos aqueles que, de alguma maneira, me apoiaram durante o longo período em que procurei concretizar este “velho” projecto profissional e pessoal, estas páginas de abertura nunca serão suficientes para exprimir o quanto lhes estou agradecido. Que possam as minhas atitudes e comportamentos para com eles corresponderem ao que de mim sempre esperaram.

À Senhora Professora Teresa Marques, minha assistente de Microbiologia no já longínquo ano de 1980, minha “madrinha” na iniciação à docência microbiológica, na secular sala de aulas do Instituto Bacteriológico Câmara Pestana, minha chefe durante os anos da minha passagem pelo Hospital de Santa Cruz, onde o meu contacto com o CMV foi iniciado por sua recomendação, minha directora no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas e minha orientadora na presente tarefa, a minha gratidão por tantos anos de paciência, incentivo e, porque não, particularmente nos últimos tempos, de pressão para que eu pudesse atingir os objectivos profissionais a que me propunha. Sem ela nunca teria chegado à escrita desta dissertação.

À Dra. Sofia Almeida, minha companheira das lides virológicas, durante e após os meus tempos beirões, o meu profundo reconhecimento pelo seu apoio incondicional, pedra angular em vários passos desta minha tarefa.

A todos os elementos da equipa do Laboratório de Microbiologia do Hospital de Santa Cruz, em particular à Mestre Teresa Baptista Fernandes e à Dra. Eduarda Cardoso, e aos clínicos que colaboraram connosco no diagnóstico pré-natal,

contribuindo desta forma para a experiência relatada no capítulo “Diagnóstico pré-natal da infecção citomegálica.”

À Prof<sup>a</sup>. Maria Barbi, do Instituto de Virologia de Milão, por me ter permitido conhecer a “sua” técnica dos cartões e pela disponibilidade que sempre manifestou para qualquer esclarecimento que eu lhe tenha solicitado.

À Doutora Laura Vilarinho, pelo apoio prestado na selecção e fornecimento dos cartões.

À Dra. Madalena Almeida Santos, pela quantificação da AD-169 que utilizei como padrão na fase 3 do ensaio das *pools*.

À Professora Paula Videira, ao Doutor Dário Ligeiro e ao Dr. João Sobral, pelo apoio na técnica de PCR em tempo real.

Ao Dr. João Faro-Viana pelos conselhos na abordagem estatística do capítulo “Diagnóstico pré-natal da infecção citomegálica”.

Aos colegas das instituições que enviaram produtos biológicos para análise e as respectivas informações clínicas, laboratoriais e ecográficas (capítulo “Diagnóstico pré-natal da infecção citomegálica”) e à Dra. Corinne Liesnard (Hôpital Erasme), pela execução dos testes de nested-PCR nos líquidos amnióticos entre 1994 e 1998.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia, Prof<sup>a</sup>. Laura Brum, Prof. Luís Távira, Dra. Cristina Toscano, Dra. Júlia Piedade e Dra. Virgínia Loureiro, os meus agradecimentos pelas palavras de estímulo e pela amizade sempre presente no nosso relacionamento.

Aos restantes elementos do Departamento, Mestre Ana Sofia, Lúcia, Otília, Luisa, D. Olívia e D. Mariana, pelo apoio pessoal que sempre me deram.

A todos os elementos do Laboratório do Hospital da Luz em geral, mas em particular à Dra. Sofia Cassamo, pela compreensão por algumas ausências minhas, nestes últimos meses, devido à preparação deste manuscrito.

Ao Prof. Artur Torres Pereira, meu primeiro Mestre na ciência microbiológica, quando eu era um jovem candidato à entrada no Curso de Medicina em 1977, por ter despertado e estimulado o meu desejo de dedicar-me ao então misterioso e excitante estudo dos microrganismos.

## Resumo

O vírus citomegálico humano (CMV) é o principal agente de infecção congénita, atingindo cerca de 0.2 a 2.2% de todos os recém-nascidos. As crianças que nascem infectadas por este vírus têm cerca de 11% a 12.7% de probabilidades de apresentarem sintomas e sinais de doença citomegálica ao nascimento, podendo cerca de 40 a 58% destas virem a apresentar sequelas neurológicas permanentes. Das crianças infectadas que terão infecção assintomática no período neo-natal, 5 a 15% poderão vir igualmente a sofrer de sequelas tardias, sobretudo a surdez ou o atraso mental.

Em Portugal, desconhece-se a dimensão deste problema. O primeiro objectivo desta dissertação foi, desta forma, a determinação da prevalência através do recurso aos cartões do diagnóstico precoce (“Guthrie cards”), utilizando uma técnica de *nested*-PCR dirigida para o vírus. Foram estudados 3600 cartões, seleccionados de todo o território nacional (continente e ilhas), de uma forma proporcional ao número de nascimentos em cada distrito, dos quais 38 foram positivos, o que dá uma prevalência de 1.05% (intervalo de confiança para 95%: 0.748-1.446).

A revisão sobre a experiência acumulada nos últimos 15 anos, na área do diagnóstico pré-natal, juntamente com um estudo adicional sobre a técnica da avidez, permitiu retirar algumas ilações, nomeadamente que este diagnóstico constitui uma arma diagnostica fiável para a avaliação pré-natal desta infecção congénita e que a selecção dos casos para amniocentese deverá obedecer a indicações serológicas precisas, como a “seroconversão para IgG” ou a “IgM confirmada” (devendo o método de confirmação ser a avidez das IgG com um índice  $<0,6$ ) e as alterações ecográficas de etiologia não esclarecida.

A possibilidade de utilizar *pools* de urinas para detectar a infecção congénita por CMV foi abordada na terceira parte do trabalho experimental. A metodologia aí descrita teve correlação total com o método de referência, permitindo uma redução bastante significativa nos tempos de execução e nos custos em consumíveis, pelo que abre a possibilidade da sua utilização para o rastreio da infecção congénita por CMV nos recém-nascidos.



## Abstract

The Human cytomegalovirus (CMV) is the most frequent cause of congenital infection, occurring in 0.2 to 2.2% of all live births. Among infected children, 11% to 12.7% are symptomatic at birth, and 40 to 58% of these will develop permanent neurological sequelae. In addition, 5 to 15% of symptom-free neonates have also long term sequelae, mainly deafness and mental retardation.

The prevalence in Portugal is not known. Therefore, the first objective of this work was the determination of CMV prevalence by using a *nested*-PCR technique in dried blood spots (“Guthrie cards”). In total, 3600 cards from newborns from all regions of Portugal were studied, with the number of cards studied being proportional to the number of births in each region, of which 38 cards were positive, giving a prevalence of 1.05% (95% confidence interval: 0.748-1.446).

The review of our experience obtained in the last 15 years and the results of the study of the avidity test, allowed us to draw some conclusions about the prenatal diagnosis, namely that this is a useful approach to diagnose fetal infection, and that the selection of cases of amniocentesis should be based on precise serological results, like “IgG seroconversion” or “Confirmed IgM” (IgM confirmed with an avidity index  $<0.6$ ) and ultrasound abnormalities of unknown etiology.

The possibility of using urine pools for diagnosis of CMV congenital infection is presented in the third part of the experimental work. This method had total correlation when compared with the reference method, allowing a significant reduction, both in terms of labour and cost of testing materials, which opens the possibility of using this technique for screening the CMV congenital infection in newborns.

## Índice

|  |    |
|--|----|
| 1.Introdução.....  | 3  |
| 2.Revisão bibliográfica.....                               | 9  |
| 2.1 História.....  | 10 |
| 2.2 Taxonomia.....   | 12 |
| 2.3 Estrutura.....   | 13 |
| 2.4 Replicação.....  | 14 |
| 2.5 Epidemiologia.....                                     | 16 |
| 2.6 Apresentação clínica das infecções citomegálicas       |    |
| 2.6.1 Infecção no hospedeiro imunocompetente.....          | 18 |
| 2.6.2 Infecção no hospedeiro imunodeprimido.....           | 22 |
| 2.6.3 Infecção congénita e peri-natal.....                 | 28 |
| 2.7 O diagnóstico laboratorial das infecções citomegálicas |    |
| 2.7.1 Introdução.....                                      | 34 |
| 2.7.2 Técnicas mais utilizadas no diagnóstico das          |    |
| Infecções citomegálicas.....                               | 34 |
| 2.7.3 Diagnóstico laboratorial das infecções citomegálicas |    |
| consoante os diferentes hospedeiros.....                   | 42 |
| 3. Trabalho experimental                                   |    |
| 3.1 Estudo da prevalência da infecção congénita pelo vírus |    |
| citomegálico humano em Portugal                            |    |
| 3.1.1 Objectivos.....                                      | 48 |
| 3.1.2 Material e métodos.....                              | 48 |
| 3.1.3 Resultados.....                                      | 52 |
| 3.1.4 Discussão.....                                       | 54 |
| 3.2 Diagnóstico pré-natal da infecção citomegálica.        |    |
| 3.2.1 Objectivos .....                                     | 59 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.2 O diagnóstico serológico.....  | 59 |
| 3.2.3 O diagnóstico da infecção fetal.....   | 63 |
| 3.2.4 Discussão.....   | 69 |
| 3.3 Diagnóstico da infecção congénita citomegálica através da<br>detecção do ADN vírico em <i>pools</i> de amostras de urina |    |
| 3.3.1 Objectivos.....  | 76 |
| 3.3.2 Material e métodos.....  | 76 |
| 3.3.3 Resultados.....  | 84 |
| 3.3.4 Discussão.....   | 89 |
| 4. Conclusões.....   | 93 |
| 5. Bibliografia.....   | 97 |

## **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO**

A ideia de me candidatar a uma tese de doutoramento surgiu, com alguma naturalidade, em 1997. Na altura tinha catorze anos de experiência docente na área da Microbiologia Médica e alguma experiência num tema que me cativava desde 1992, o Vírus citomegálico humano (CMV).

Com a mudança da Prof<sup>a</sup>. Teresa Marques para o Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, como Directora, e com o convite da mesma para eu integrar a sua equipa neste Departamento, tudo parecia estar encaminhado para a apresentação da minha candidatura a doutoramento quando, em 1999, por motivos pessoais, familiares e profissionais, tomei a decisão de assumir o cargo de Director do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira e de me ligar à Universidade da Beira Interior. Foi aqui onde, mantendo o privilégio de continuar com a mesma orientadora, apresentei a minha candidatura com o tema “Estudo das infecções pelo Vírus citomegálico humano”.

No entanto, motivos familiares fizeram-me regressar a Lisboa em 2003. Foi-me então concedida a possibilidade de regressar ao Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, o que motivou que a minha inscrição na Universidade da Beira Interior ficasse sem efeito e que apresentasse nova candidatura na Faculdade de Ciências Médicas.

Nesta altura, fazia todo o sentido para mim manter o título da candidatura à tese de doutoramento. Embora já tivesse dado alguns passos na vertente experimental da infecção congénita na Covilhã e soubesse que esta área do CMV era claramente aquela a que me tinha dedicado mais nos últimos anos, eu tinha esperanças de conseguir alargar o âmbito da tese a outras duas áreas, as infecções nos doentes imunocompetentes e nos imunodeprimidos, de forma a continuar a justificar a manutenção do título.

Com o decorrer do tempo fui verificando que esta abrangência era muito difícil de manter. O meu contacto com o CMV, no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas, era sobretudo na área da infecção congénita, embora tivesse tido a oportunidade de co-orientar duas teses de mestrado que tiveram como temas, respectivamente, a detecção genotípica da resistência ao ganciclovir em estirpes de CMV detectadas em doentes imunodeprimidos e a aplicação de uma técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico das infecções por este vírus em doentes transplantados.

Assim, e após consultar a minha orientadora, decidi que o tema da tese deveria ser restringido ao âmbito da infecção congénita, concentrando-me assim na matéria da minha predilecção e onde houvera uma continuidade de investigação nos últimos anos.

Que linha orientadora foi essa? Desde que me propus iniciar esta tarefa, pareceu-me que a prioridade deveria ser dada ao conhecimento da prevalência que esta infecção congénita poderá ter no nosso país. Nenhum programa de rastreio e de prevenção poderá ser implementado se não se souber a dimensão do problema, se não conhecermos o número de crianças afectadas por esta infecção em Portugal. O intervalo descrito na literatura, 0.2 a 2.2% (Revello, 2004), é demasiado vasto para estimarmos com rigor a carga que esta infecção impõe à nossa comunidade. Assim, o estudo da prevalência da infecção congénita em Portugal transformou-se no objectivo principal da minha tese, estando os resultados desse estudo expressos no capítulo com esse nome, “Estudo da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal”.

Que seja do nosso conhecimento, apenas um estudo sobre a prevalência desta infecção em populações portuguesas foi objecto de publicação (Lopo e col., 2004). Neste estudo, que utilizou o método de referência para o diagnóstico da infecção congénita, a pesquisa do vírus na urina por cultura celular, 0.7% dos recém-nascidos tiveram este teste positivo. No entanto, o estudo foi efectuado na população abrangida por apenas um hospital, pelo que se torna difícil a extrapolação dos resultados para a determinação da prevalência a nível nacional.

Para a correcta determinação desta última, deveriam ser colhidas amostras de urina de recém-nascidos em todo o território nacional e de uma forma proporcional ao número de nascimentos por cada região ou distrito. Dado que esta amostragem se torna praticamente impossível de obter, uma vez que implicaria colheitas em todas as maternidades do país, optámos por uma outra abordagem, a utilização dos cartões do diagnóstico precoce (“Guthrie cards”) para o estudo da prevalência a nível nacional.

O teste do diagnóstico precoce consiste na utilização de um papel de filtro, o “Guthrie card”, no qual é colhido sangue do recém-nascido e que depois de seco é enviado para um laboratório de referência nacional ou regional para a realização de testes de rastreio, nomeadamente para o hipotiroidismo congénito e para a fenilcetonúria. Actualmente este teste é realizado em Portugal a todos os recém-

nascidos, sendo todos os cartões enviados para o Instituto de Genética Médica Jacinto Magalhães (IGMJM), no Porto, que centraliza a realização dos testes de rastreio e o armazenamento do sangue restante para posteriores utilizações sempre que necessário. Este facto tornou possível a obtenção de amostras colhidas em recém-nascidos de todo o território nacional e de uma forma proporcional ao número de nascimentos por cada região ou distrito. A aplicação destes cartões para o diagnóstico da infecção congénita por CMV foi descrita por uma equipa italiana, em 1996, que com uma técnica de *nested*-PCR obtiveram 100% de sensibilidade e 99% de especificidade, quando comparada com o método de referência (Barbi e col., 1996). Embora estes números sejam aceitáveis para um diagnóstico de rotina, em situações em que a prevalência seja mais elevada, são inaceitáveis para um estudo epidemiológico numa população em que a prevalência esperada será perto de 1%; nestas circunstâncias, o valor preditivo positivo não ultrapassaria os 50%. Assim, o primeiro passo do projecto “Estudo da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal”, foi o de determinar a sensibilidade e a especificidade com a técnica originalmente descrita pela equipa italiana, mas modificando ligeiramente os critérios de interpretação, de forma que a especificidade se aproximasse dos 100%. Caso este objectivo fosse atingido, proceder-se-ia à determinação da prevalência a nível nacional com cartões recolhidos de todos os distritos do país, o que veio a acontecer na segunda fase deste estudo.

Mas se o conhecimento do número de crianças infectadas era um primeiro passo fundamental, só a identificação dessas mesmas crianças poderia ter efeitos práticos na qualidade de vida das mesmas. Para essa detecção, apenas programas de rastreio pré-natal e/ou pós-natal poderão ser eficazes, dado que a grande maioria das infecções por este vírus são assintomáticas.

Relativamente ao rastreio pré-natal destas infecções, deve ser referido que não se trata de uma prática universal, sendo mesmo discutível a sua aplicação (Grangeot-Keros., 1998). Os avanços nesta área estão particularmente dependentes da capacidade de intervenção médica no tratamento das infecções intra-uterinas, matéria que está a ser alvo de ensaios terapêuticos a nível internacional (Nigro e col., 2005; Jacquemard e col., 2007). Só quando se conseguir esta intervenção, o rastreio deverá ser efectivamente universal.

A contribuição para o avanço do diagnóstico pré-natal, de forma a que este proporcione, desde já, uma resposta de qualidade, e que no futuro possa ser parte integrante e fiável de um rastreio pré-natal, pareceu-me importante, e, dessa forma, a experiência de vários anos nesta matéria foi incluída nesta dissertação. Esta experiência foi o resultado da minha “passagem” por três equipas, das quais tive a oportunidade de ser o coordenador: secção de virologia e serologia do Laboratório de Microbiologia do Hospital de Santa Cruz (1992-1999), secção de virologia do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira (2000-2003) e secção de virologia do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas (2003 até ao presente). A revisão desta experiência procurou abordar os aspectos mais delicados do diagnóstico pré-natal, tais como a detecção das infecções primárias nas grávidas e a fiabilidade das amniocenteses no diagnóstico da infecção fetal.

Como já foi referido, o rastreio para o diagnóstico pré-natal das infecções por este vírus não é uma prática universal. Por outro lado, o papel das reinfecções tem sido realçado recentemente, sendo provavelmente mais importante do que inicialmente descrito (Boppana e col., 2001). A conjugação destes dois factos condiciona que a grande maioria das infecções congénitas por CMV não seja detectada, em nenhum país, pelos métodos habitualmente utilizados. Assim, o rastreio nos recém-nascidos é a única forma de detectar todos os casos de infecção congénita, não sendo, no entanto, possível efectuar culturas virais em todos os recém-nascidos (Yow, 1989), devido sobretudo ao elevado custo e ao tempo de execução das mesmas. Efectuar técnicas de biologia molecular, nomeadamente a técnica da “Polymerase chain reaction” (PCR) em amostras de urina (Schlesinger, 2003) poderá simplificar a execução mas não a redução de custos. Assim, se quiséssemos manter como objectivo a detecção laboratorial de todos os casos de infecção congénita, ter-se-ia de equacionar uma metodologia que permitisse realizar um diagnóstico fiável mas que, ao mesmo tempo, fosse economicamente viável, de forma a permitir a sua utilização num rastreio. Foi este propósito que levou à ideia da utilização de *pools* de urinas, numa tentativa de contribuir com uma metodologia que reduzisse drasticamente o custo por análise, mantendo a mesma sensibilidade e especificidade do método de referência. Assim, o objectivo deste trabalho foi o de demonstrar se o princípio utilizado em alguns bancos de sangue (Allain, 2000), ou seja, o recurso a *pools* de amostras com o intuito de reduzir significativamente custos e



tempos de execução, poderia ser aplicado ao diagnóstico da infecção congénita por CMV. Nesse sentido, foi aplicada uma técnica de *nested-PCR* em *pools* de amostras de urina de crianças com e sem infecção por CMV e, mais tarde, ensaiada uma técnica de PCR em tempo real.

Este estudo foi dividido em três fases: na primeira, as amostras de urina foram testadas isoladamente pela técnica de *nested-PCR* e comparadas com a cultura viral (método shell-vial, que funcionou como o método de referência neste estudo). Esta primeira fase incluiu ainda experiências de cruzamentos (misturar uma amostra positiva com 19 negativas) para testar a capacidade do método em detectar uma única amostra positiva numa *pool* de 20 amostras. Na segunda fase, esta metodologia das *pools* foi ensaiada com todas as amostras de urina de crianças recebidas no Centro Hospitalar Cova da Beira para o diagnóstico de infecção por CMV, durante um período de 14 meses. Na terceira fase, foi ensaiada uma técnica de PCR em tempo real, na Faculdade de Ciências Médicas, com o objectivo de simplificar a execução desta detecção nas *pools*.

Desta forma, foi arquitectado o presente trabalho, concentrando-se a vertente prática em duas componentes: o estudo da prevalência da infecção congénita pelo CMV em Portugal e a avaliação de metodologias que permitam a detecção desta infecção quer no período pré-natal quer no pós-natal. A escolha destas metodologias teve em conta a conciliação entre a sensibilidade/especificidade, a exequibilidade e o factor económico, com vista a poderem ser utilizadas em futuros programas de rastreio.

## **CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1 História

As infecções causadas pelo Vírus citomegálico humano (CMV) foram descritas pela primeira vez em 1904, numa publicação alemã, por Jesionek e Kiolemenoglu. Estes autores mencionaram a presença de “células gigantes” nos pulmões, rins e fígado de um nado-morto, designadas como “protozoan like”, uma vez que observaram a presença de umas inclusões intranucleares, rodeadas de um halo, atribuindo-as à presença de um parasita intra-celular. Nesse mesmo ano, Ribbert publica um artigo no qual refere que tinha observado células semelhantes em 1881, num rim de um nado-morto e, posteriormente, em glândulas parótidas de crianças, mas que só depois de ler a publicação de Jesionek e Kiolemenoglu decidiu relatar esses achados.

Na década de 20, verificou-se que existiam algumas semelhanças entre as alterações histológicas provocadas pelos agentes da varicela e do herpes genital e as originadas por este novo agente. Este facto levou, pela primeira vez, a suspeitar-se de que um agente vírico poderia estar na génese das inclusões observadas nos nado-mortos. Na década seguinte, Faber e Wolbach demonstraram que este agente deveria ser comum, ao encontrarem inclusões semelhantes nas glândulas salivares de 26 crianças, isto numa amostragem de 183 crianças autopsiadas devido a morte por diferentes causas. No entanto, só em 1950 a designação “generalized cytomegalic inclusion disease (CID)” foi sugerida por Wyatt e colaboradores, embora a etiologia vírica continuasse a ser ignorada (Ho, 2008).

Só em 1956 o CMV foi isolado em culturas celulares por três equipas, sendo-lhe atribuído em 1960 a designação de *Cytomegalovirus*, de acordo com os efeitos produzidos nas células em cultura (Riley, 1997; Zuckerman e col., 2004).

Nas décadas seguintes, foram inúmeras as contribuições que possibilitaram avanços importantes nesta área, tornando-se, desta forma, difícil fazer a sua selecção. No entanto, podemos referir algumas das publicações que tiveram um papel mais marcante no estabelecimento do estado actual do saber sobre este vírus e as infecções por ele provocadas:

- Rowe descreveu que a seroprevalência era elevada para este vírus (81% no seu estudo) e que aumentava progressivamente com a idade, demonstrando que o CMV é comum na espécie humana (Rowe e col, 1956).

- Relativamente à transmissão, alguns trabalhos pioneiros revelaram a importância das principais vias de transmissão: perinatal (Reynolds e col., 1973; Numazaki e col., 1970; Stagno e col., 1980), sexual (Lamb e col., 1966; Chretien e col., 1977; Handsfield e col. 1985), por transplantação (Ho e col., 1975) e por transfusão (Diosi e col., 1969).

- Klemola descreve pela primeira vez em 1965 um quadro semelhante à mononucleose infecciosa, causado por CMV (Klemola e col., 1965).

- Na temática da infecção congénita, e depois das descobertas históricas já referidas, devemos realçar o papel que uma equipa de Alabama tem desempenhado, papel que se iniciou nos anos 70 e que se manteve até ao presente, com contributos essenciais para a compreensão desta matéria, nomeadamente na área da transmissão (Stagno e col., 1980; Fowler e col., 2006), na importância da infecção primária *versus* infecção recorrente (Stagno e col., 1982; Boppana e col., 1999; Fowler e col., 2003), nas repercussões clínicas (Dahle e col., 1974; Boppana e col., 1992; Boppana e col., 2005) ou no diagnóstico (Stagno e col., 1975; Balcarek e col., 1993). Outras contribuições fundamentais, ainda no âmbito da infecção congénita, foram conseguidas por três equipas italianas, particularmente na área da patogénese (Revello e col., 1998) e nos diagnósticos pré-natal (Lazzarotto e col., 1998) e pós-natal tardio (Barbi e col., 1996).

- Nas infecções em doentes submetidos a transplantação, para além de algumas descrições pioneiras por Rifkind e a sua equipa, que devem ser realçadas (Rifkind e col., 1964; Rifkind e col., 1965, Hill RB Jr e col., 1967; Rifkind e col., 1967), podemos salientar a importante contribuição que uma equipa holandesa forneceu para diagnóstico precoce destas infecções, com a descrição da técnica da antígenemia, (van der Bij e col., 1988; The e col., 1990), antes do aparecimento das técnicas de biologia molecular, e que igualmente cumpriam este objectivo de precocidade (Gerna e col., 1991; Vlieger e col., 1992). Ainda dentro do contexto do doente imunodeprimido, mas no que se refere aos doentes infectados pelo Vírus da imunodeficiência humana (VIH), o trabalho de uma equipa de San Diego, publicado em 1999, mostrou que a carga vírica do CMV tinha um valor preditivo mais elevado que a própria carga vírica do HIV-1, no que se refere à mortalidade destes doentes (Spector e col., 1999).

Em Portugal, o CMV começou a despertar o interesse dos clínicos sobretudo quando se iniciaram as transplantações de órgãos no nosso país, na década de 80. Durante essa década o papel do laboratório nesta matéria era, no entanto, muito reduzido, resumindo-se ao diagnóstico serológico que, como será abordado mais

adiante, tem importantes limitações no diagnóstico da infecção por CMV no doente imunodeprimido. Também o interesse dos obstetras e dos pediatras pela infecção congénita citomegálica esbarrava com a falta de resposta laboratorial capaz de diagnosticar com eficácia esta infecção. Assim, algumas equipas destacaram-se pela introdução de técnicas que permitiram melhorar esta prestação laboratorial, como a equipa de virologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, que iniciou a técnica de antigenémia no nosso país e o Laboratório de Microbiologia do Hospital de Santa Cruz, pioneiro entre nós na técnica de cultura rápida “shell-vial”. Outras deram, igualmente, contribuições importantes, das quais salientaremos, por traduzirem parcialmente o seu trabalho em artigos científicos indexados, a equipa da Unidade de Biologia Molecular do Serviço de Microbiologia do Hospital de S. António, que publicou um interessante trabalho comparativo entre a antigenémia e duas técnicas de biologia molecular (Amorim e col., 2001), o Departamento de Doenças Infecciosas dos Hospitais da Universidade de Coimbra, na área clínica do doente VIH (Rabadão e col., 1999), os Departamentos de Transplantação e Nefrologia do Hospital Curry Cabral, no papel do CMV na transplantação (Brum e col., 2008), a equipa de Cardiologia do Hospital de Santa Cruz (conjuntamente com o laboratório de Microbiologia do mesmo hospital), pelo estudo da relação entre as infecções citomegálicas e os acidentes coronários agudos (Timóteo e col., 2003) e o Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira, pelos seus trabalhos no domínio da infecção congénita (Paixão e col., 2005; Sousa e col., 2006).

## 2.2 Taxonomia

O CMV pertence à família *Herpesviridae*, sub-dividida em três sub-famílias, respectivamente a *Alphaherpesvirinae*, a *Betaherpesvirinae* e a *Gammaherpesvirinae* (ver tabela 1). O CMV faz parte da sub-família *Betaherpesvirinae*, género *Cytomegalovirus*, sendo reconhecido pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* como a espécie *Human herpesvirus 5*. Este comité aceita, respectivamente como acrónimo e sinónimo, as designações “HHV-5” e “Human cytomegalovirus”, embora esta última não seja considerada designação oficial (Büchen-Osmond, 2006). Assim, a sua designação oficial em português deveria ser “Vírus do herpes humano 5”,

se bem que seja habitualmente referido como “Vírus citomegálico humano” (Paixão e col., 2002) ou “Vírus citomegalo” (Lopo e col., 2004).

Tabela 1: Vírus da família *Herpesviridae* patogénicos para o homem (adaptado de “ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>”)

| Sub-família                | Género                   | Espécie  |
|----------------------------|--------------------------|--|
| <i>Alphaherpesvirinae</i>  | <i>Simplexvirus</i>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vírus do herpes humano 1 (vírus do herpes simples 1)</li> <li>• Vírus do herpes humano 2 (vírus do herpes simples 2)</li> </ul> |
|                            | <i>Varicellovirus</i>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vírus do herpes humano 3 (vírus da varicela-zoster)</li> </ul>  |
| <i>Betaherpesvirinae</i>   | <i>Cytomegalovirus</i>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vírus do herpes humano 5 (vírus citomegálico humano)</li> </ul>   |
|                            | <i>Roseolovirus</i>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vírus do herpes humano 6</li> <li>• Vírus do herpes humano 7</li> </ul>   |
| <i>Gammapherpesvirinae</i> | <i>Lymphocryptovirus</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vírus do herpes humano 4 (vírus de Epstein-Barr)</li> </ul>   |
|                            | <i>Rhadinovirus</i>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vírus do herpes humano 8</li> </ul>   |

## 2.3 Estrutura

No que se refere à estrutura, este vírus contém, tal como os outros membros da família *Herpesviridae*, uma nucleocápside, um invólucro e o tegumento, com um diâmetro de aproximadamente 150nm. A nucleocápside compreende o genoma vírico e a cápside, sendo esta última formada por 162 capsómeros e rodeada por uma zona mal demarcada, o tegumento, região esta que contém enzimas que ajudam na replicação (Gibson, 1996).

Relativamente ao genoma vírico, este é composto por ADN de cadeia dupla, contendo entre 220 e 240Kb, sendo dividido em duas sequências ou regiões, denominadas respectivamente “curta” e “longa” (“Unique short sequence” and “Unique

long sequence”). Cada uma destas sequências pode estar orientada em dois sentidos, do que resulta a possibilidade de aparecimento de quatro isómeros. Os genes costumam estar numerados consoante as suas posições nos isómeros e as proteínas que eles codificam são designadas por *p*, *pp* ou *gp*, respectivamente para “proteína”, “fosfoproteína” e “glicoproteína”. Assim e como exemplo, *gpUL75* significa uma glicoproteína produzida na posição 75 da sequência longa. Mais de 200 proteínas produzidas pelo CMV foram já identificadas, embora apenas uma minoria tenha funções definidas (Pignatelli e col., 2004).

O invólucro contém glicoproteínas que desempenham várias funções no ciclo biológico vírico, nomeadamente a interacção com os receptores celulares no primeiro passo da replicação, sendo algumas delas igualmente responsáveis pelo desencadear da resposta imune conducente ao aparecimento dos anticorpos neutralizantes (Britt e col., 1996).

## 2.4 Replicação

A replicação deste vírus segue a cascata de eventos habitualmente descritos para os membros da família *Herpesviridae*. De uma forma resumida, pode-se esquematizar a replicação nas seguintes fases:

- Reconhecimento da célula alvo;
- Ligação aos receptores celulares por intermédio das glicoproteínas de superfície, seguida de fusão do invólucro com a membrana plasmática;
- Ligação da cápside à membrana nuclear, seguida de libertação do genoma vírico para dentro do núcleo;
- Transcrição e translacção dos genes em três fases:
  1. Genes imediatamente precoces (“immediate-early” (IE) ou  $\alpha$ -genes): são genes que vão originar proteínas não estruturais do mesmo nome (proteínas imediatamente precoces) que, por sua vez, activam os genes seguintes.
  2. Genes precoces (“early” ou  $\beta$ -genes): são genes que vão originar proteínas não estruturais do mesmo nome que consistem sobretudo em

enzimas essenciais para a replicação, como a *pUL54*, uma ADN polimerase. A replicação do genoma começa nesta fase.

3. Genes tardios (“late” ou  $\gamma$ -genes): são genes que vão originar proteínas estruturais do mesmo nome, proteínas essas que fazem parte da cápside e do invólucro. As primeiras são sintetizadas no citoplasma das células e migram seguidamente para o núcleo, de modo a formarem a cápside que englobará o ADN replicado na fase anterior (encapsidação), enquanto que às segundas são adicionados hidratos de carbono, no retículo endoplasmático, formando glicoproteínas que vão então para a membrana nuclear.

- As nucleocápsides passam pelas membranas nucleares, nas zonas que contêm as glicoproteínas, são transferidas para o complexo de Golgi e posteriormente libertadas por exocitose (eventualmente por lise celular) para o exterior (Murray, 2005).

O CMV tem um ciclo de replicação relativamente longo, por comparação com o dos outros membros da família *Herpesviridae*, sendo este o motivo da visualização habitualmente tardia do efeito citopático nas culturas celulares (Revello e col., 2004). Deve ainda ser referido que o CMV tem a capacidade de infectar *in vivo* uma grande variedade de células, entre as quais se incluem fibroblastos, macrófagos, células epiteliais, endoteliais e musculares, apesar de *in vitro* apenas nos fibroblastos se conseguir multiplicá-lo facilmente (Sinzger e col., 1995). Embora o CMV possa ser detectado nos leucócitos do sangue periférico, quer durante a infecção primária nos imunocompetentes (Revello e col., 1998) quer nas infecções primária e recorrente nos imunodeprimidos (Gerna e col., 1991), estes não parecem suportar o ciclo replicativo completo deste vírus, permitindo apenas a expressão dos genes imediatamente precoces e não avançando mais na cascata de eventos anteriormente referidos (Gerna e col., 2000). Assim, parecem ser as células endoteliais as principais responsáveis pela virémia verificada durante as infecções citomegálicas (Percivalle e col., 1993; Hahn e col., 2004).



## 2.5 Epidemiologia

O CMV tem, à semelhança dos outros membros da família *Herpesviridae*, a capacidade de ficar latente após a infecção primária. Posteriormente, o hospedeiro poderá sofrer uma reactivação com a mesma estirpe ou adquirir uma nova infecção com uma outra estirpe, sendo este último processo chamado de reinfecção. Estes dois últimos processos são também denominados infecções recorrentes (Malm e col., 2007).

Todas as infecções anteriormente referidas, primária, reactivação e reinfecção, podem transmitir o CMV o que, aliado à capacidade de este vírus se transmitir pelas vias vertical e horizontal e dados os múltiplos locais de excreção do mesmo, amplifica a possibilidade de transmissão. Assim, as taxas de seropositividade para este vírus, em populações adultas, são elevadas, habitualmente superiores a 50%, existindo uma relação inversa entre estas e os índices socioeconómicos, as primeiras baixando com o aumento dos segundos (Kenneson e col., 2007). Em Portugal, a seroprevalência aumenta com a idade, à semelhança do que acontece noutros locais (Griffiths e col., 1984), rondando os 80% a partir dos 30 anos (Lopo e col., 2004).

Relativamente às formas de transmissão, a primeira, do ponto de vista cronológico, efectua-se durante a gravidez, originando a infecção congénita (Kenneson e col., 2007). Mais tarde, a passagem pelo canal de parto e, sobretudo, a amamentação, fornecem novas oportunidades de o CMV se transmitir, designando-se esta transmissão de perinatal que, por sua vez, vai originar uma infecção com o mesmo nome (Stagno e col., 1980. Ver capítulo “Infecção congénita e peri-natal”).

O contacto com outras crianças, particularmente nos infantários, é o factor mais importante para a transmissão nas crianças mais velhas; a excreção prolongada e intensa do CMV na urina e na saliva nas crianças com infecção congénita ou peri-natal, favorece a transmissão neste contexto (Alford e col., 1990). As crianças infectadas desta forma transmitem, com alguma facilidade, o vírus aos seus pais, podendo, inclusivamente, originar uma infecção congénita, caso a mãe se encontre novamente grávida na altura da infecção (Pass e col., 1986; Pass e col., 1987).

A infecção adquirida mais tarde resulta, habitualmente, de um contacto com a saliva, embora a sua presença no espermatozóide e nas secreções cervicais sugiram que este agente possa ter, igualmente, uma transmissão sexual, o que é apoiado por alguns estudos epidemiológicos (Handsfield e col., 1985; Hyams e col., 1993; Staras e col.,

2008). Não é clara, no entanto, a contribuição relativa da relação sexual genital, uma vez que o beijo acompanha habitualmente a relação sexual (Collier e col., 1990; Zuckerman e col., 2004).

A transmissão através da transfusão tornou-se rara, sobretudo desde que se utilizam estratégias de utilização de produtos sanguíneos seronegativos ou desleucocitados nos receptores seronegativos para transplantação (Vamvakas, 2005). A explicação para os bons resultados obtidos com a desleucocitação parece passar pela importância dos monócitos, uma vez que o vírus existe em estado latente sobretudo nestas células e, assim, não seria transmitido através do sangue desleucocitado (Söderberg e col., 1993; Roback, 2002).

A transmissão do CMV através de órgãos transplantados ficou claramente demonstrada com estudos de marcação epidemiológica efectuados na década de oitenta, onde para além da infecção primária também se provou que pode ocorrer reinfecção, com uma nova estirpe transmitida pelo dador, em receptores previamente seropositivos. Estes estudos demonstraram que todos os órgãos de dadores seropositivos deverão ser encarados como infecciosos, independentemente do estado imunitário do receptor, embora as infecções primárias se acompanhem, habitualmente, de quadros sintomáticos com maior frequência que as reinfecções (Chou, 1986; Grundy e col., 1988). Estas conclusões, aplicadas inicialmente à transplantação renal, puderam rapidamente estender-se a outros tipos de transplantação de órgãos sólidos (Patel e col., 1997).

Relativamente à transplantação de medula óssea, a infecção no receptor poderá dever-se ao dador seropositivo, à semelhança do que acontece na transplantação de órgãos sólidos (Bowden e col., 1986). Também a reactivação (Winston e col., 1985) e a transfusão (Tegtmeier, 1989) podem assumir um papel na génese desta infecção, embora, tal como referido anteriormente, a transmissão através de transfusão seja actualmente prevenida com elevada eficácia (Narvios e col.; 2001 Vamvakas, 2005).

## **2.6 Clínica das infecções citomegálicas**

### **2.6.1 Infecção no hospedeiro imunocompetente**

A infecção por CMV, adquirida após o nascimento, apresenta-se habitualmente como uma infecção assintomática. Assim, embora a maioria da população adulta tenha sido infectada por este vírus, apenas uma pequena percentagem desenvolve clínica como resultado da infecção primária. O denominado “síndrome mononucleósico” é o conjunto de manifestações mais frequente quando o CMV produz doença no imunocompetente, o que acontece em cerca de 10% dos casos de infecção. Como o nome sugere, trata-se de um quadro com algumas semelhanças com a mononucleose infecciosa, causada pelo vírus de Epstein-Barr, embora as adenopatias sejam menos frequentes na infecção citomegálica (Wreghitt e col., 2003), sobretudo nos adultos, sendo nas crianças a percentagem de casos com adenopatias mais elevada (Pannuti e col., 1985). O mesmo se passa com a faringite, menos frequente na infecção por CMV em qualquer escalão etário, mas sendo essa diferença mais marcada no adulto, dada a relativa raridade de faringite exsudativa, por CMV, neste último (Begovac e col. 1988).

Numa revisão de 115 casos de infecção primária no hospedeiro imunocompetente (Bonnet e col., 2001), os sintomas mais frequentes foram a febre (95%), artralgias e mialgias (41%), arrepios (32%), dor abdominal (26%), tosse não produtiva (20%), e diarreia (10%). O exame físico detectou hepatomegália (25%), esplenomegália (23%), adenopatia (19%), faringite (9%), icterícia (3%) e sinais de irritação meníngea (1%). Dezassete doentes tiveram manifestações gastrointestinais (colite, gastrite do antro ou colecistite), oito tiveram alterações hematológicas diversas, dois destes com púrpura trombocitopénica imune e um com púrpura trombocitopénica trombótica, dois com pneumonia intersticial, dois com pericardite, dois com um quadro semelhante à polimialgia reumática e um com vasculite cutânea. Houve alterações hepáticas em 90% dos casos e 64% dos doentes tiveram linfocitose atípica. Os autores concluíram dizendo que a infecção citomegálica deve ser suspeitada em doentes com febre persistente, isolada ou acompanhada de sinais pouco específicos, sempre que não se obteve rapidamente um diagnóstico etiológico.

O aparecimento de infecções graves no imunocompetente tem sido relatado como

raro, mas possível. Várias publicações têm mencionado essa eventualidade, sendo de realçar duas revisões da literatura, sendo a primeira efectuada por Eddleston e col. (1997), em que num período de 29 anos (entre 1966 e 1995) apenas encontraram 34 casos de infecção grave, dos quais 14 associados a corticoterapia. Foram registados 14 óbitos, dos quais 7 nos doentes submetidos a corticoterapia. Independentemente do critério, discutível, de incluir os doentes submetidos a corticoterapia, esta revisão demonstra que as infecções severas são raras mas podem revestir-se de extrema gravidade, mesmo nos imunocompetentes sem factores de risco associados, sobretudo quando envolvem vários órgãos ou sistemas. Numa segunda revisão, mais recente, foram encontradas 290 infecções consideradas como graves e que atingiam particularmente o aparelho gastrointestinal, causando sobretudo colite, e o sistema nervoso central, com meningite, encefalite e mielite transversa como principais quadros clínicos. Os autores desta revisão concluem dizendo que as infecções graves por este vírus e nestes hospedeiros podem ser mais frequentes do que habitualmente se pensava (Rafailidis e col., 2008).

Dentro das complicações específicas de órgão, presumivelmente originadas pela infecção primária por este vírus em hospedeiros imunocompetentes, descritas na literatura, são de referir as que atingem os seguintes órgãos ou sistemas:

- Aparelho gastrointestinal: a colite, embora rara no imunocompetente, pode causar morbilidade e mortalidade significativas (Galiatsatos e col., 2005). É habitualmente resultado de uma infecção primária, com diarreia, febre e dor abdominal como os sintomas mais descritos, sendo a diarreia acompanhada de hemorragia em cerca de metade dos casos e por vezes manifestando-se de uma forma profusa (Klauber e col., 1998). A presença de alterações das mucosas antes da infecção por CMV pode aumentar o risco de infecção por este agente, como tem sido relatado para as doenças inflamatórias intestinais, particularmente a colite ulcerosa (Kaufman e col., 1999). A colite a CMV pode também mimetizar a colite isquémica, particularmente no idoso com diarreia com sangue e dor abdominal (Siegal e col., 2005). Este vírus tem sido igualmente incriminado como agente de esofagite (Villar e col., 1984) e ileíte (Taniwaki e col., 1997) em doentes imunocompetentes.

Ao contrário das manifestações anteriores, o atingimento hepático, traduzido sobretudo por um aumento subclínico das transaminases, é muito frequente na infecção primária (Just-Nubling e col., 2003), atingindo cerca de 90% dos infectados, tal como

já foi acima referido (Bonnet e col., 2001). Embora sendo uma eventualidade bastante rara, o CMV deve ser incluído no diagnóstico diferencial da hepatite granulomatosa, manifestando-se habitualmente apenas por febre prolongada. (Bonkowsky e col., 1975).

- Sistema nervoso: o CMV tem sido associado a complicações do foro neurológico. Este vírus deve ser considerado no diagnóstico diferencial das encefalites do imunocompetente, embora seja uma causa rara desta patologia (Prosch e col., 1998). Numa revisão de dez casos de encefalite isolada não houve casos fatais e apenas um doente manteve defeitos neurológicos persistentes seis meses após o diagnóstico (Eddleston e col., 1997).

O síndrome de Guillain-Barré tem sido associado a uma variedade de agentes, incluindo o CMV. Numa publicação recente, em 42 doentes com esta patologia, o CMV foi detectado no LCR em 13 destes (31%), não tendo este sido encontrado nos 41 doentes com encefalopatia aguda que serviram de controlo (Steininger e col., 2004). Num outro estudo, o CMV foi o segundo agente a ser detectado, a seguir ao *Campylobacter jejuni*, com 13% dos casos positivos (Jacobs e col., 1998), embora a metodologia seguida neste estudo, a serologia, não permita conclusões tão fidedignas como a detecção do vírus ou do seu genoma no LCR. Os doentes com síndrome de Guillain-Barré associado ao CMV foram descritos como sendo geralmente mais novos e com alterações sensoriais, insuficiência respiratória e alterações dos nervos cranianos mais marcadas do que os doentes com esta patologia associada ao *Campylobacter jejuni* ou na sua forma idiopática (Visser e col., 1996).

Outras manifestações neurológicas descritas incluem a neuropatia periférica axonal difusa (Lopez-Contreras e col., 1995) e a mielite transversa (Tyler KL e col., 1986; Giobbia e col., 1999; Fux e col., 2003), ambas referidas como manifestações raras no hospedeiro imunocompetente.

- Sistema cardiovascular: a pericardite e a miocardite foram descritas como complicações da infecção primária em imunocompetentes, parecendo que o papel do CMV poderá ser relevante particularmente na miocardite (Campbell e col., 1995; Kyto e col., 2005; Kuhl e col., 2005).

No entanto, dentro do contexto do sistema cardiovascular, é na aterosclerose que o papel do CMV tem sido mais discutido, paralelamente ao da *Chlamydia pneumoniae*, sendo estes dos agentes que mais atenções têm recebido pela sua associação com esta patologia (High, 1999, Watson e col., 2008). Estudos têm relacionado a doença

coronária aterosclerótica e a reestenose após aterectomia e angioplastia com infecção antiga por CMV (Sorlie e col., 2000; Zhou e col., 1996; Blum e col., 1998, Gredmark e col., 2007), mas outros trabalhos não corroboram esta hipótese (Manegold e col., 1999; Carlsson e col., 2000; Adler e col., 1998, Reszka e col., 2008), pelo que o papel do CMV como agente aterogénico continua em discussão.

- Outros órgãos ou sistemas: o CMV como agente de infecção pulmonar ou ocular em imunocompetentes tem sido descrito como eventualidade bastante rara (Cohen e col., 1985; Lopez-Contreras e col., 1995), assim como outras manifestações, como o síndrome da secreção inapropriada de hormona antidiurética (Sato e col., 2004), a anemia hemolítica grave (Veldhuis e col., 2004), ou a trombose da veia porta (Squizzato e col., 2007).

Deve, ainda, ser referido que publicações recentes chamam a atenção para a infecção por CMV em doentes em unidades de cuidados intensivos, embora com resultados discordantes (Stephan e col., 1996; Kutza e col., 1998; Heininger e col., 2001). Estas discordâncias poderão dever-se a diferentes sensibilidades analíticas dos métodos utilizados, às patologias subjacentes ou ao desenho do estudo. No entanto, parece claro que o choque séptico é um factor de risco para a reactivação do CMV, com cerca de um terço dos doentes com este quadro a exibirem sinais de infecção por este vírus, embora o seu papel no agravamento da situação clínica, para além de um prolongamento do tempo de ventilação assistida e de permanência na unidade de cuidados intensivos, permaneça por esclarecer (von Müller e col., 2006).

Relativamente à terapêutica, deve ser reforçado que, como a grande maioria das infecções por CMV nestes doentes é assintomática ou ligeira, não está indicada terapêutica anti-virica nestes casos. No entanto, o conhecimento actual sugere que, nas infecções graves, a resposta terapêutica a drogas como o ganciclovir ou o foscarnet pode ser mais favorável que a evolução clínica sem tratamento. Deve aqui salientar-se que ensaios terapêuticos controlados são difíceis de realizar devido ao baixo número de infecções graves nestes hospedeiros (Eddleston e col., 1997; Laing. e col., 1997; Rafailidis e col., 2008).

### **2.6.2 Infecção no hospedeiro imunodeprimido**

O CMV tem sido descrito como um agente oportunista importante em pacientes imunodeprimidos, particularmente em dois contextos: no doente submetido a transplantação (de órgão sólido e de medula óssea) onde é referido como o agente infeccioso mais frequente (van Son e col., 1989) e em doentes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (VIH), sendo nestes últimos mencionado como um dos agentes oportunistas mais importantes (Gallant e col., 1992).

#### **Infecção no doente submetido a transplantação de órgão sólido**

A infecção por CMV ocorre na maioria dos doentes submetidos a transplantação de órgão sólido, sobretudo nos primeiros três meses após a transplantação, quando a imunossupressão é mais intensa, atingindo valores entre 50 e 90%, com infecção sintomática em cerca de 7 a 33% (Kanj e col., 1996). A percentagem de infecção sintomática (doença por CMV) parece variar significativamente consoante o órgão transplantado, sendo o rim referido habitualmente como o que apresenta percentagem mais baixa, o pâncreas e coração/pulmão as mais elevadas, sendo a transplantação de coração, fígado e intestino as que registam valores intermédios (Reyes e col., 1992; Lumbreras e col., 1993; Ho, 1994).

O CMV é transmitido habitualmente através do órgão transplantado ou dos produtos sanguíneos, sendo o primeiro a principal causa, sobretudo se se utilizam estratégias de utilização de produtos sanguíneos seronegativos ou desleucocitados nos receptores seronegativos (Vamvakas, 2005).

Dois padrões de infecção podem verificar-se: a infecção primária, quando o receptor que nunca foi infectado por CMV (CMV seronegativo) desenvolve infecção após a transplantação, e a infecção recorrente, definida como a detecção de CMV num indivíduo seropositivo nas análises pré-transplante. A infecção recorrente poderá dividir-se em reactivação (quando o vírus latente é reactivado devido à imunossupressão) e reinfeção (quando um doente seropositivo para CMV recebe um órgão infectado e desenvolve infecção com a nova estirpe recebida) (Ljungman e col., 2002). Cabe aqui mencionar que alguns autores se referem à reactivação como infecção

secundária e à reinfecção como superinfecção. A seguir à infecção primária efectua-se as respostas das imunidades celular e humoral, que desta forma vão controlar, sobretudo a celular, a replicação viral, mantendo assim o CMV no estado de latência, característico do hospedeiro imunocompetente. A imunossupressão administrada no início da transplantação leva à perda deste controlo, o que explica as elevadas taxas de infecção e de doença por este vírus, nestes doentes imunodeprimidos (Chou, 1987).

Os principais factores de risco para o aparecimento de doença por CMV incluem a infecção primária, adquirida iatrogenicamente na transplantação, e o nível de imunossupressão, com algumas drogas utilizadas para tratamento da rejeição, como a globulina anti-timócito ou o anticorpo monoclonal OKT3, a terem um papel significativo na replicação viral. O micofenolato de mofetil tem sido referido como uma droga imunossupressora capaz de aumentar a incidência da doença citomegálica, mas nem todos os trabalhos são unânimes nessa conclusão (Sarmiento e col., 2000; Giral e col., 2001; Abbott e col., 2002).

Os efeitos do CMV nos doentes transplantados podem dividir-se em três grupos:

- Síndromos infecciosas – as manifestações clínicas são extremamente variáveis, desde a infecção assintomática às infecções severas, potencialmente letais. A maior parte dos casos de infecção são, no entanto, ligeiras ou moderadas, constituindo o denominado “síndrome do CMV em transplantados de órgãos sólidos”, que é caracterizado pela presença de febre (temperatura > 38°C, durante pelo menos dois dias num período de quatro dias), leucopénia ou trombocitopénia, acompanhadas da detecção de CMV no sangue (Ljungman e col., 2002). Mialgias e artralgias, estas últimas por vezes acompanhadas de franca artrite, ocorrem com alguma frequência, mas o síndrome mononucleósico que habitualmente surge nos doentes imunocompetentes raramente aparece neste contexto (Rubin, 1990).

O atingimento dos órgãos por CMV correlaciona-se habitualmente com o órgão transplantado. Assim, a hepatite, a pancreatite, a pneumonia e a miocardite ocorrem com maior probabilidade, respectivamente nos transplantados hepáticos, pancreáticos, pulmonares ou coração/pulmão e cardíacos (Patel e col., 1997). Nos transplantados renais, a infecção por CMV tem sido associada a uma glomerulopatia, por provável lesão endotelial directa (Onuigbo e col., 2002).

O aparelho gastrointestinal pode ser afectado em todos os tipos de transplantação e todos os segmentos do mesmo poderão ser atingidos, desde o esófago ao recto. Esta



capacidade de atingir qualquer porção deste sistema, explica a diferente sintomatologia que pode acompanhar estas infecções, e que pode incluir a disfagia, a odinofagia, as náuseas, os vômitos, a dor abdominal, a diarreia ou a hemorragia gastrointestinal (Griffiths e col., 2000; Ponticelli e col., 2005).

Dentro de outras possíveis manifestações de infecção citomegálica em órgãos específicos, poderá ainda referir-se a retinite, embora esta seja descrita como um fenómeno raro no doente transplantado, afectando menos de 5% destes pacientes (Ho, 1994) e apresentando-se habitualmente para lá do primeiro ano de transplante (Ng e col., 1998).

- Como potenciador de outras infecções oportunistas, devido ao seu efeito imunossupressor - o CMV tem, por si só, um efeito imunossupressor que potencia o efeito da imunossupressão iatrogénica. Pensa-se ser esta a explicação para a associação entre a infecção citomegálica e o aparecimento de outras infecções oportunistas, como infecções fúngicas ou por *Pneumocystis jiroveci* (Rubin, 1989; Paya e col., 1993; George e col., 1997).

A interacção entre o CMV e o vírus de Epstein-Barr, como potenciador do desenvolvimento de doença linfoproliferativa pós-transplante, tem originado resultados contraditórios, não sendo possível definir o papel do CMV como factor de risco para esta patologia (Manez e col., 1997; Shahinian e col., 2003; Green e col., 2006).

A associação entre os vírus do herpes humano 6 (HHV6) e 7 (HHV7) com a infecção citomegálica no doente transplantado parece ter alguma consistência, embora o papel destas interacções não esteja bem esclarecido, provavelmente pelo facto destes vírus causarem virémias muitas vezes sobreponíveis às do CMV, pelo que se torna difícil atribuir um papel patogénico, neste contexto, a cada um destes *Roseolovirus*, particularmente ao HHV7 (Härmä e col., 2006). Analisando a literatura, podemos, no entanto, efectuar algumas considerações sobre estas eventuais associações. As cargas víricas dos HHV6 e HHV7 foram descritas como mais elevadas quando as cargas víricas de CMV estavam igualmente mais elevadas, parecendo, desta forma, existir alguma correlação entre as infecções por estes vírus (Kidd e col., 2000; Mendez e col., 2001). No entanto, o HHV7 raramente está associado a clínica, (Rayes, 2005; Lehto e col., 2007; Antón e col., 2008), enquanto o HHV6 parece estar etiológicamente ligado a exantemas e supressão medular em transplantados de medula óssea, disfunção do enxerto na transplantação hepática, e encefalite, hepatite e pneumonia em diferentes

tipos de transplantação (Lautenschlager e col., 2000; Yoshikawa, 2003; Clark e col., 2003; Volin e col., 2004). Assim, embora a patogenicidade directa destes vírus, particularmente o HHV7, pareça limitada, os seus papéis como eventuais co-factores na infecção citomegálica transformam estes vírus em agentes importantes no contexto da transplantação, embora ainda esteja por definir qual a melhor estratégia diagnóstica e terapêutica para lidar com os mesmos. Por outro lado, o papel do CMV como agente potenciador de infecções oportunistas pelos HHV6 e HHV7, não parece consistente na análise da literatura.

- Associação à rejeição do enxerto – esta associação tem sido descrita sobretudo em duas formas distintas: como rejeição precoce do enxerto em doentes submetidos a transplantação renal e como rejeição crónica em transplantados cardíacos, manifestando-se, neste caso, como aterosclerose nas artérias do enxerto, embora nem todos os trabalhos publicados estejam de acordo relativamente a este ponto (Sagedal e col., 2005).

Relativamente à profilaxia e tratamento destas infecções, algumas linhas de orientação têm surgido nos últimos anos, embora persistam ainda divergências. A profilaxia com drogas com acção potente anti-CMV, como o ganciclovir ou a sua pró-droga, o valganciclovir, é recomendada pela American Society of Transplantation para utilização nos casos de “dador-positivo” com “receptor-negativo”, durante o período de maior incidência da infecção citomegálica. No entanto, se a incidência de doença citomegálica diminui com esta profilaxia, durante o período de utilização da mesma, um fenómeno relativamente novo tem sido descrito na literatura: a chamada doença tardia por CMV, que se caracteriza, como o nome indica, pelo aparecimento das manifestações da infecção citomegálica após o período de profilaxia (Singh, 2006). Assim, a profilaxia com drogas potentes anti-CMV teria não só o efeito de inibir a replicação viral durante o período da profilaxia, mas também poderia inibir o desenvolvimento de uma resposta imunitária celular duradoura e protectora contra o vírus, atrasar a seroconversão das IgG e inibir a maturação dos anticorpos (Steininger e col., 2004). De referir que a doença tardia por CMV em doentes submetidos a transplantação está significativamente associada com a mortalidade no primeiro ano após a transplantação (Limaye, 2004), o que leva alguns autores a aconselharem apenas a utilização da chamada terapêutica “preemptive” (tratamento da infecção citomegálica quando surge o primeiro sinal laboratorial da mesma - ver mais à frente “Diagnóstico

das infecções pelo vírus citomegálico humano”) em todas as situações, mesmo nos casos de risco de infecção primária (Singh, 2006). Outros autores admitem não existir clara vantagem quando se comparam os regimes profilático e “preemptive” (Puius e col., 2007).

### **Infecção no doente submetido a transplantação de medula óssea**

A infecção por CMV nos doentes submetidos a transplantação de medula óssea segue os mesmos princípios gerais da transplantação de órgãos sólidos no que se refere à transmissão, padrões de infecção e período de maior incidência. No entanto, embora a febre, acompanhada de leucopénia e hepatite, possa fazer parte do quadro clínico causado por esta infecção, a pneumonia e o envolvimento gastrointestinal são as manifestações mais frequentes de doença citomegálica nestes doentes, com a doença tardia por CMV a constituir, à semelhança do que acontece com a transplantação de órgãos sólidos, um fenómeno emergente nos regimes de profilaxia prolongada (Goodrich e col., 1994; Castagnola e col., 2004), mas aqui com uma mortalidade que atinge valores mais elevados (Nguyen e col., 1999; Boeckh e col., 2003).

Complicações pulmonares podem ocorrer em cerca de 40 a 60% dos doentes submetidos a transplantação de medula óssea, podendo ser responsáveis por mais de 90% da mortalidade verificada neste tipo de transplantação, sendo o CMV um importante agente destas complicações, particularmente no período entre o segundo e quarto meses após a transplantação (Wang e col., 2004; Yen e col., 2004). Dentro das complicações gastrointestinais, contam-se a gastrite, a colite e a esofagite (McDonald e col., 1985; Fiegl e col., 2005).

No que se refere à profilaxia e tratamento destas infecções, as questões que se colocam no transplante de órgão sólido repetem-se na transplantação de medula óssea, relativamente às vantagens e desvantagens da profilaxia *versus* terapêutica “preemptive” (Razonable e col., 2003; Szer e col., 2004; Verkruyse e col., 2006). Deve ainda ser realçada a utilização do valaciclovir para profilaxia da infecção citomegálica nestes doentes (Winston e col., 2003), estratégia essa também utilizada por algumas equipas na transplantação de órgãos sólidos (Squifflet e col., 2002).

### **Infecção no doente previamente infectado com o vírus da imunodeficiência humana**

A infecção citomegálica era das infecções oportunistas mais frequentes nos doentes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) antes da introdução da terapêutica anti-retrovírica de elevada eficácia (“HAART”), atingindo cerca de 40% dos doentes nos estádios mais avançados (Drew, 1992; Bowen e col., 1996). Com a introdução da “HAART” em 1995-1996, que trouxe o conceito da combinação de pelo menos três drogas anti-víricas de diferentes classes, assistiu-se a uma baixa radical da prevalência da infecção e consequente doença por CMV, devido à reconstituição do sistema imunitário que impede a replicação do CMV (Palella e col., 1998; O’Sullivan e col., 1999; Deayton e col., 2000; Mocroft e col., 2000).

Uma contagem de células CD4 abaixo dos  $100/\text{mm}^3$  é considerada como o principal factor de risco para a infecção citomegálica em doentes VIH-positivos, sendo esta infecção, por seu lado, um factor de risco independente para a progressão da infecção pelo VIH e sua consequente morbilidade e mortalidade (Gallant e col., 1992; Sabin e col., 2000). Já na época “HAART”, um considerável número de doentes infectados ainda mantém níveis de contagens de células CD4 abaixo dos  $100/\text{mm}^3$ , devido a várias razões: por não aderirem ou não tolerarem os regimes prescritos; por não terem acesso aos mesmos (isto, em países em desenvolvimento); porque a subida dos CD4 demora, habitualmente, um mínimo de seis meses para se concretizar após o início da “HAART”, permitindo, assim, um período de maior susceptibilidade; devido à resistência de algumas estirpes de VIH aos anti-retrovíricas; ou, simplesmente, porque em 10 a 20% dos doentes em “HAART” os CD4 não sobem acima do nível crítico de  $100/\text{mm}^3$ . Assim, apesar da dramática redução da incidência da infecção, o CMV ainda contribui significativamente para a morbilidade e mortalidade associadas à infecção pelo VIH (Steininger e col., 2006). Para além disso, a virémia por CMV continua, mesmo na época “HAART”, a ser considerada como um factor de risco independente na mortalidade nos doentes com SIDA, actuando como co-factor imunossupressor nestes doentes (Griffiths, 2006; Jabs e col., 2005; Wohl e col., 2005).

Dentro das manifestações clínicas, a retinite ocupa um lugar de destaque, sendo a manifestação mais frequente de doença citomegálica no doente com infecção por VIH,

seguida da infecção gastrointestinal, podendo esta última envolver todo o aparelho gastrointestinal, com formação de úlceras (Gallant e col., 1992; Yust e col., 2004). A encefalite, embora rara, tem uma mortalidade elevada em doentes não tratados, sendo a resposta à terapêutica apenas parcial, levando a uma estabilização mas não à resolução do quadro clínico (McCutchan, 1995; Griffiths, 2004).

Uma outra manifestação atribuída à acção do CMV é o denominado “síndrome inflamatório da imuno-reconstituição”. Este quadro aparece exclusivamente em doentes que apresentavam retinite antes do início da “HAART” e nos quais a boa resposta imunitária a esta terapêutica resolve a retinite mas leva, numa percentagem significativa de casos que poderá mesmo ultrapassar os 50%, ao quadro de vitrite (Karavellas e col., 1999). Este fenómeno deve-se, paradoxalmente, à boa resposta que alguns dos doentes exibem à “HAART”, mas que ao desenvolverem uma resposta imunitária exagerada a antígenos persistentes do CMV, esta pode levar ao quadro de vitrite, geralmente durante as 8 semanas que se seguem à instituição da “HAART” no doente (Deayton e col., 2000; Cheng e col., 2000).

Outras manifestações, como a pneumonia, são relativamente pouco frequentes em doentes infectados pelo VIH (Gallant e col., 1992).

### **2.6.3 Infecção congénita e peri-natal**

#### **Infecção congénita**

O vírus citomegálico humano (CMV) é o principal agente de infecção congénita, atingindo cerca de 0.2 a 2.2% de todos os recém-nascidos (Revello e col., 1999). Segunda uma meta-análise recente (Kenneson e col., 2007), que se baseou em publicações efectuadas entre 1996 e 2006, a média obtida foi de 0.64%, mas os autores sublinham importantes diferenças entre os vários estudos, por vezes dentro da mesma cidade. Tal facto é igualmente sublinhado numa segunda meta-análise, em que a prevalência geral se estimou em 0.7% (Dollard e col. 2007).

Tal como será referido no capítulo “Estudo da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal”, apenas um estudo sobre a prevalência da infecção congénita por CMV foi publicado em Portugal até ao momento, mas a

prevalência detectada foi em apenas um hospital, situando-se nos 0.7% (Lopo e col., 2004).

Numa das meta-análises já referidas, verifica-se que alguns factores parecem ter um papel importante no aumento da prevalência desta infecção, como a raça não-caucasiana ou o baixo nível socioeconómico, mas a seroprevalência materna seria o factor que isoladamente parece mais relevante, contribuindo com 29% da variação obtida na prevalência da infecção dos recém-nascidos. Esta análise estima ainda que um aumento em 10% na seroprevalência resultaria num aumento, aparentemente paradoxal, de 0.26% na prevalência da infecção congénita detectada nos recém-nascidos (Kenneson e col., 2007).

Para se compreender este efeito paradoxal, deve-se referir que a probabilidade de transmissão ao feto é maior após infecção primária na grávida (Guerra e col., 2000), atingindo valores na ordem dos 32%, segundo a meta-análise acima mencionada (Kenneson e col., 2007). As infecções recorrentes, divididas em reactivações e reinfecções, têm um papel menos claro neste contexto que o atingimento descrito no período anterior. Várias publicações demonstram que a probabilidade de infecção congénita será bastante menor em grávidas com imunidade prévia para o CMV (Fowler e col., 2003), com valores perto dos 1.4% de transmissão materno-fetal (Kenneson e col., 2007). Além disso, nos casos em que se efectua a transmissão fetal, a gravidade seria igualmente menor por comparação com a infecção primária (Stagno e col., 1982).

Uma das explicações para esta diferença poderá ser encontrada num outro trabalho que demonstrou que a virémia estava presente, e de forma constante, durante os primeiros meses após a infecção primária da grávida, proporcionando assim muitas oportunidades ao vírus de atingir e infectar a placenta. Na reactivação do imunocompetente a virémia não aconteceu em nenhum dos casos estudados, pelo que se deduziu que a probabilidade de atingimento da placenta seria, naturalmente, muito menor no caso de reactivação na mulher grávida (Revello e col., 1998).

No entanto, as infecções recorrentes têm sido recentemente descritas como responsáveis por um número importante de casos de infecção congénita, embora seja difícil determinar na literatura a real percentagem de casos que se devem a estas infecções (Naessens e col., 2005; Dar L e col. 2007). É possível que, dentro do grupo das infecções secundárias, sejam as reinfecções as principais responsáveis pelo atingimento fetal, estando demonstrado que estas podem originar casos de infecção

sintomática ao nascimento e o aparecimento de sequelas tardias, embora numa percentagem inferior à da infecção primária (Boppana e col., 2001; Ross e col., 2006).

Assim, como explicar o efeito paradoxal que um aumento na seroprevalência para o CMV numa população de grávidas, em vez de conferir protecção para a infecção congénita por CMV (uma vez que diminui a probabilidade de infecção primária e esta tem valores de transmissão muito superiores aos verificados na infecção recorrente), aumenta a prevalência desta infecção nos recém-nascidos? Várias hipóteses podem ser avançadas, mas provavelmente a explicação passará pelo elevado número de mulheres seropositivas que sofrerão reactivação, reactivação esta que, embora em apenas 1.4% dos casos possa transmitir o vírus ao feto, poderia acabar por ser responsável por um número apreciável de casos de infecção congénita. Outra hipótese seria o facto de, numa população com elevada seroprevalência para o CMV, ser consequentemente mais elevado o risco de contacto com o CMV. Assim, nesta população, a probabilidade de reinfeção aumentaria substancialmente e, com ela, o risco de transmissão. De notar que numa população com maior seroprevalência, o risco de adquirir CMV seria maior quer para as seropositivas, com o referido risco de reinfeção, quer para as minoritárias seronegativas, que ficariam em maior risco de adquirir uma infecção primária (Kenneson e col., 2007).

Como já foi acima referido, o mecanismo de infecção fetal implica uma prévia virémia, parecendo como mais provável a teoria de que os leucócitos maternos infectariam as células endoteliais uterinas, as quais, por estarem em contacto directo com as células epiteliais constituintes do citotrofoblasto, infectariam estas últimas. Por sua vez, estas infectariam fibroblastos das vilosidades coriônicas e células endoteliais dos capilares fetais, com a posterior disseminação no compartimento vascular fetal. Uma hipótese alternativa seria a dos leucócitos infectados poderem atingir directamente o endotélio através de falhas na camada do sinciciotrofoblasto, particularmente no terceiro trimestre da gravidez. Uma terceira possibilidade seria, ainda, a passagem do vírus, por transcitose, através da camada do sinciciotrofoblasto, infectando os citotrofoblastos subjacentes (Revello e col., 2004).

As crianças que nascem infectadas por este vírus têm cerca de 11% a 12.7% de probabilidades de apresentarem sintomas e sinais de doença citomegálica ao nascimento (Kenneson e col., 2007; Dollard e col. 2007). Os sintomas e sinais podem incluir baixo peso, petéquias, púrpura, hepatomegália, esplenomegália, icterícia ao nascimento,

coriorretinite, alterações neurológicas sem outra etiologia identificada, calcificações intracranianas, trombocitopenia ou aumento da alanina aminotransferase (Istas e col., 1995). Destas crianças sintomáticas, cerca de 40 a 58% poderão apresentar sequelas permanentes, tais como a surdez ou o atraso mental (Dollard e col. 2007). Das crianças infectadas que terão infecção assintomática no período neo-natal, 5 a 15% (13.5%, segundo a meta-análise de Dollard e col.) poderão vir igualmente a sofrer de sequelas tardias, sobretudo as já referidas surdez sensorineural ou o atraso mental (Lazarotto e col., 1999; Foulon e col., 2008). Deve ser referido que as percentagens mencionadas neste parágrafo foram obtidas por intermédio de estudos ou meta-análises em que não foram separados os resultados da infecção primária dos da infecção recorrente, reflectindo assim as consequências concretas que a infecção congénita por CMV terá numa determinada população pediátrica, independentemente do tipo de infecção.

Relativamente ao período de gestação em que a infecção primária é adquirida, a frequência de transmissão é variável, com a probabilidade mais baixa no período imediatamente antes ou à volta da concepção (cerca de 5% de taxa de transmissão), rondando os 45% no primeiro e segundo trimestres e aumentando para perto de 79% no último trimestre, segundo alguns trabalhos (Revello e col., 2004; Gindes e col., 2008). O CMV não segue, no entanto, um padrão de lesão fetal tão rígido como o da rubéola, em que a partir da 16ª semana a probabilidade de existir uma lesão fetal importante é extremamente reduzida (Miller e col., 1982). Assim, embora a probabilidade de lesão fetal, traduzida pelo aparecimento das principais manifestações clínicas, como a surdez sensorineural ou as sequelas no sistema nervoso central, seja maior nos casos de transmissão no primeiro trimestre, a transmissão para além deste período pode resultar igualmente no surgimento destas sequelas (Pass e col., 2006). De referir que este último estudo apenas contempla as sequelas resultantes da infecção primária, desconhecendo-se a relação entre a gravidade da infecção e o período da transmissão vertical nos casos de infecção secundária.

O papel do CMV como agente de surdez infantil é conhecido há cerca de quatro décadas (Medearis, 1964), mas tem recebido uma grande atenção nos últimos anos, ao verificar-se que o CMV é um dos dois principais causadores de surdez nas crianças, a par da mutação no gene GJB2, codificador da conexina 26 (Morton e col., 2006). A percentagem de casos de surdez sensorineural infantil atribuída ao CMV tem atingido valores na ordem dos 20 a 30%, ultrapassando mesmo os 40% nos casos de surdez mais



profunda (Barbi e col., 2003). Na nossa experiência, a percentagem de casos atinge 20% das crianças com surdez sensorineural, embora neste estudo não tivesse sido efectuada uma estratificação consoante o grau de gravidade (Almeida e col., 2006). A surdez causada pelo CMV é descrita como uni ou bilateral (esta última em cerca de 50% dos casos), profunda (em cerca de 23% dos casos), e de início tardio em mais de metade dos casos (Barbi e col., 2006). Este último facto tem como consequência que o rastreio audiológico neo-natal apenas detectará a surdez causada por este agente em 30 a 50% dos casos (Fowler e col., 1997), pelo que só o rastreio virológico permitirá o seguimento destas crianças (ver capítulo “Diagnóstico da infecção congénita citomegálica através da detecção do ADN viral em pools de amostras de urina”).

A prevenção primária desta infecção congénita tem sido relegada para segundo plano, sendo muitas vezes considerada como ineficaz (Cannon e col., 2005). No entanto, medidas para evitar o contacto com a saliva e a urina de crianças infectadas, como a lavagem frequente das mãos, (particularmente após a mudança das fraldas, após o banho ou o contacto com os brinquedos), evitar a partilha dos talheres, comida ou escovas de dentes, evitar beijar na boca e não partilhar as toalhas, são descritas como eficazes na redução significativa da transmissão do CMV à mulher grávida (Adler e col., 1996; Adler e col., 2004). A vacinação permanece, por enquanto, apenas como uma futura possibilidade de prevenção (Griffiths e col., 2005), embora alguns autores questionem o papel protector de uma vacina na reinfeção da grávida, o que poderia comprometer, pelo menos parcialmente, a eficácia da mesma (Gaytant e col., 2002).

Outro nível de prevenção seria na transmissão materno-fetal. Aqui reconhece-se que, se não se conseguir o objectivo principal que é evitar a infecção materna, pode-se procurar diminuir a transmissão vertical do vírus, prevenindo a infecção do feto. Uma publicação recente lançou alguma esperança de que se possa actuar farmacologicamente para diminuir a probabilidade de transmissão (Nigro e col., 2005), embora estes resultados com imunoterapia anti-vírica necessitem de confirmação através de estudos randomizados (Duff, 2005).

Outra forma de actuação seria na prevenção de complicações, em fetos ou crianças infectadas pelo CMV. Relativamente à primeira situação, não existe, ainda, terapêutica eficaz para o tratamento intra-uterino desta infecção, embora o trabalho acima mencionado registe resultados promissores no que se refere à melhoria ecográfica dos fetos infectados e na clínica apresentada pelos mesmos ao nascimento (Nigro e col.,

2005). No entanto, também neste caso se recomenda a confirmação cuidadosa dos resultados obtidos neste estudo, antes de se generalizarem as conclusões do mesmo (Duff, 2005). Noutra publicação, o recurso ao valaciclovir para tratamento da infecção fetal apresenta resultados modestos, embora se tenham verificado diminuições significativas das cargas víricas no sangue dos fetos infectados (Jacquemard e col., 2007).

Relativamente ao tratamento pós-natal da infecção congénita por CMV, embora não exista consenso relativamente a todos os pontos, algumas recomendações podem ser retiradas da literatura. Assim, parece consensual que a infecção congénita sintomática deverá ser tratada com ganciclovir, uma vez que este diminui a probabilidade de aparecimento de surdez tardia. No entanto, a mesma droga, dada a sua toxicidade e ao facto da probabilidade do aparecimento de sequelas tardias ser menor nas crianças assintomáticas, não deverá ser administrada a estas últimas (Kimberlin e col., 2003). Assim, nas crianças infectadas assintomaticamente, apenas o rastreio e o seguimento acima referidos poderão permitir uma actuação precoce, não farmacológica, que possa minimizar as sequelas, particularmente a surdez sensorioneural (ver capítulo “Diagnóstico da infecção congénita citomegálica através da detecção do ADN viral em *pools* de amostras de urina”).

### **Infecção perinatal**

As infecções perinatais pelo CMV são frequentes, sendo a sua transmissão efectuada sobretudo através do contacto com as secreções genitais, durante a passagem pelo canal de parto, e através do leite materno durante a amamentação. Este último é, de resto, considerado a principal fonte de infecção do CMV no primeiro ano de vida (Stagno e col., 1980).

As infecções perinatais são habitualmente assintomáticas no recém-nascido de termo e não se acompanham das sequelas tardias descritas a propósito da infecção congénita (Dworsky e col., 1983). A situação muda significativamente quando se fala de recém-nascidos prematuros, aumentando aqui a probabilidade de complicações. Investigadores alemães verificaram que a reactivação durante o aleitamento teve um carácter quase universal nas puérperas seropositivas para o CMV. A transmissão aos recém-nascidos aconteceu em 37% dos casos e das crianças infectadas cerca de 50%

desenvolveram sinais como neutropénia, trombocitopénia e alterações hepáticas, chegando algumas delas a desenvolver quadros parecidos à septicemia (Hamprecht e col., 2001). Números semelhantes não são, no entanto, reproduzidos por todas as equipas, embora as diferenças entre as publicações possam estar ligadas quer ao tempo gestacional e ao peso no nascimento, quer ao tratamento dado ao leite materno antes da administração à criança (Yasuda e col., 2003). Apesar destas diferenças, não parece existirem dúvidas quanto à possibilidade de infecção potencialmente grave pelo CMV no prematuro (Kerrey e col., 2006), o que leva algumas equipas a adoptarem medidas preventivas de transmissão a partir do leite materno, como o congelamento ou diferentes regimes de pasteurização do leite antes da administração à criança (Hamprecht e col., 2004; Hamprecht e col., 2008).

## **2.7 O diagnóstico laboratorial das infecções citomegálicas**

### **2.7.1 Introdução**

As técnicas utilizadas para o diagnóstico das infecções causadas pelo CMV são variadas, podendo ser aplicadas quase todas as metodologias correntemente em uso na área da virologia, embora em situações clínicas diferentes. Assim, o diagnóstico laboratorial das infecções citomegálicas acompanha a divisão que foi referida nos capítulos sobre as manifestações clínicas, ou seja, o diagnóstico vai variar consoante as situações clínicas. Desta forma, podem-se delinear as estratégias diagnósticas de acordo com os grandes grupos de pacientes afectados por este vírus, os imunocompetentes, os imunodeprimidos, as grávidas e os recém-nascidos, sendo os dois últimos integrados no contexto da infecção congénita.

Descrevem-se de seguida as técnicas utilizadas para o diagnóstico das infecções citomegálicas e, posteriormente, a sua utilização consoante as diferentes situações clínicas.

### **2.7.2 Técnicas mais utilizadas no diagnóstico das infecções citomegálicas**

#### **Citologia**

A detecção de células aumentadas de tamanho, com uma inclusão intra-nuclear basófila, dando a imagem em “olho de mocho”, é habitualmente referida como específica do CMV. Esta imagem, quando observada, permite efectuar o diagnóstico da infecção citomegálica em biópsias ou citologias, sendo mesmo exigida a sua presença em determinadas situações clínicas para confirmar o diagnóstico de doença citomegálica (ver abaixo). Como principal inconveniente desta técnica, deverá ser referida a sua baixa sensibilidade, sendo hoje utilizada quase exclusivamente nos laboratórios de anatomia patológica em exames histológicos de biópsias ou de tecidos de cadáver (Drew, 1988).

#### **Isolamento do vírus por cultura celular**

O isolamento do vírus em cultura celular é considerado como o método de referência da infecção citomegálica e, como tal, a sua especificidade é referida como de 100% (Chou, 1990). No entanto, a sensibilidade desta técnica compromete a sua utilização em algumas situações onde técnicas alternativas, como a antigenémia ou a reacção em cadeia da polimerase (PCR) são significativamente mais sensíveis, não parecendo que estes casos se devam a falsos-positivos por estas últimas, mas sim a falsos-negativos pela dita técnica de referência (Pancholi e col., 2004; Drew, 2007). A cultura convencional, que se baseia na pesquisa do aparecimento do efeito citopático do vírus (alterações citológicas na camada monocelular provocadas pelo vírus) em fibroblastos humanos de pulmão embrionário, demora cerca de quatro semanas até um resultado ser dado como negativo, o que constitui outra desvantagem desta técnica (Leland e col., 1989). Acresce que as dificuldades técnicas e os custos inerentes à manutenção de culturas celulares tornam esta metodologia apenas acessível a laboratórios de referência, o que juntamente com os pontos anteriores, torna cada vez menos frequente a sua utilização (Carman B, 2001; Ogilvie, 2001).

De forma a melhorar alguns destes inconvenientes, em particular a sensibilidade e a rapidez na resposta, entrou, desde há vários anos, na rotina dos laboratórios de virologia que utilizam culturas celulares, uma técnica denominada “shell-vial”. Esta técnica consiste numa cultura celular efectuada num tubo, tubo esse com uma lamela no fundo, na qual a cultura celular se desenvolve e onde se vai fazer a inoculação do produto a estudar. Seguidamente procede-se a uma centrifugação prolongada, possível devido à inoculação em tubo e não em placa, como na cultura convencional, centrifugação essa que supostamente facilitará o contacto do produto com a monocamada celular, promovendo, assim, a ligação das glicoproteínas víricas aos receptores celulares, aumentando a sensibilidade da detecção vírica. Seguidamente será efectuada a observação da monocamada às 24 ou 48 horas, através de técnicas de imunofluorescência, com observação de coloração dos núcleos, em caso de resposta positiva. Este último passo permite uma rapidez na resposta que seria impossível de atingir com a cultura convencional, uma vez que a técnica “shell-vial” se baseia na detecção de antígenos nucleares de aparecimento precoce no ciclo de replicação do vírus, enquanto a cultura convencional repousa na alteração citológica da célula, de aparecimento muito mais tardio no ciclo de replicação vírico (Gleaves e col., 1984; Gleaves e col., 1985).

Em suma, as culturas celulares, particularmente a técnica “shell-vial”, continuam a ser utilizadas em algumas situações de rotina, embora as suas indicações tenham vindo a limitar-se com o aparecimento de técnicas alternativas, particularmente as de biologia molecular (ver mais à frente, nos subcapítulos do diagnóstico consoante as situações clínicas).

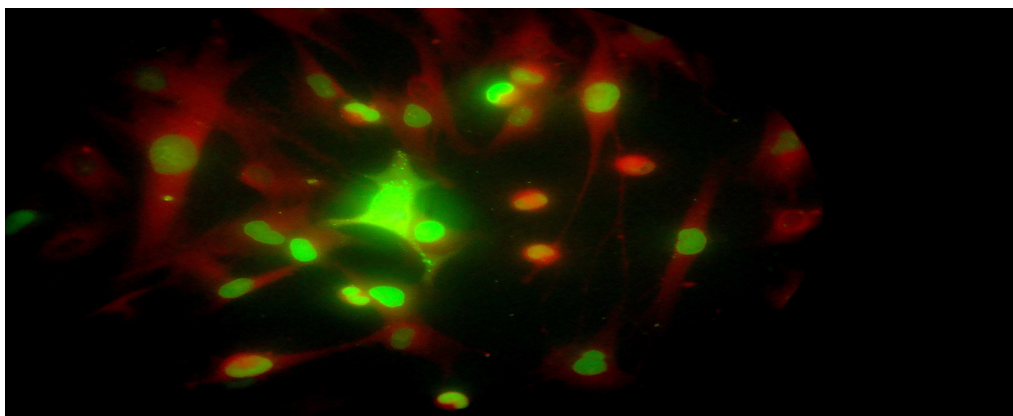


Figura 1: Técnica “shell-vial”, observando-se os núcleos dos fibroblastos fluorescentes.

### **Deteção de antígenos víricos**

Embora no passado tenha sido utilizada a detecção de antígenos do CMV directamente dos produtos patológicos, esta prática caiu em desuso nos últimos anos, devido ao aparecimento de técnicas mais sensíveis para esse fim. São excepções a utilização de anticorpos monoclonais em técnicas de detecção de CMV *in situ*, habitualmente biópsias ou lavados bronco-alveolares (Sacks e col., 1984; Emanuel e col., 1986), e a técnica da antigenémia, esta última muito utilizada para o diagnóstico e monitorização das infecções nos doentes imunodeprimidos (The e col., 1995).

Relativamente a esta última, que consiste na pesquisa do antígeno pp65 nos leucócitos do sangue periférico por técnicas de imunoperoxidase ou imunofluorescência, deve ser referido o papel histórico importantíssimo que teve no diagnóstico das infecções citomegálicas, em particular no doente submetido a transplantação, no início dos anos 90, altura em que a sua utilização se generalizou. Para o diagnóstico destas infecções nos doentes transplantados, apenas se podia recorrer à serologia, com todas as desvantagens inerentes a esta técnica (ver “Diagnóstico serológico”), ou à cultura do sangue ou da urina, mas estas com uma sensibilidade baixa, particularmente a primeira, e muitas vezes com atraso na detecção, no que se refere à segunda. A técnica da antigenémia, sendo um diagnóstico rápido, precoce (muitas vezes o teste é positivo antes do aparecimento dos sinais clínicos, possibilitando o recurso à dita terapêutica “preemptive”), com boa sensibilidade e especificidade e quantificável, permite a monitorização dos doentes com infecção activa, sujeitos ou não a tratamento (van der Bij e col., 1988; The e col., 1990; Gerna e col., 1992). Acresce que é um teste relativamente económico e que não exige equipamentos específicos para a sua realização. Como principal desvantagem, deve referir-se a necessidade de processamento laboratorial imediato (Boeckh e col., 1994), o que pode limitar o horário de recepção das amostras para esta análise. Também o facto de esta técnica detectar antígenos que se presume serem provenientes sobretudo da sua captação a partir das células endoteliais infectadas, por parte dos leucócitos, e dado que estes últimos são pouco permissivos ao ciclo completo do CMV, leva a que os antígenos possam persistir durante algum tempo após a inibição do ciclo replicativo através dos antivíricos; desta forma, eles poderiam constituir um indicador tardio de resposta à terapêutica antivírica

e, assim, não serem uma boa técnica para monitorização destas terapêuticas (Gerna e col., 2003).

Actualmente, esta técnica continua a ser utilizada para os fins acima mencionados, embora as técnicas de biologia molecular, com quantificação, estejam progressivamente a substituí-la. Isto deve-se, sobretudo, à possibilidade de armazenamento de amostras, o que permite a execução posterior desta com junção de um maior número de amostras, rentabilizando tempo e recursos económicos, para além de ser referido um aumento de sensibilidade e uma maior precisão com o recurso às técnicas de biologia molecular (Schvoerer e col., 2005; Hernando e col., 2005; Deback e col., 2007).

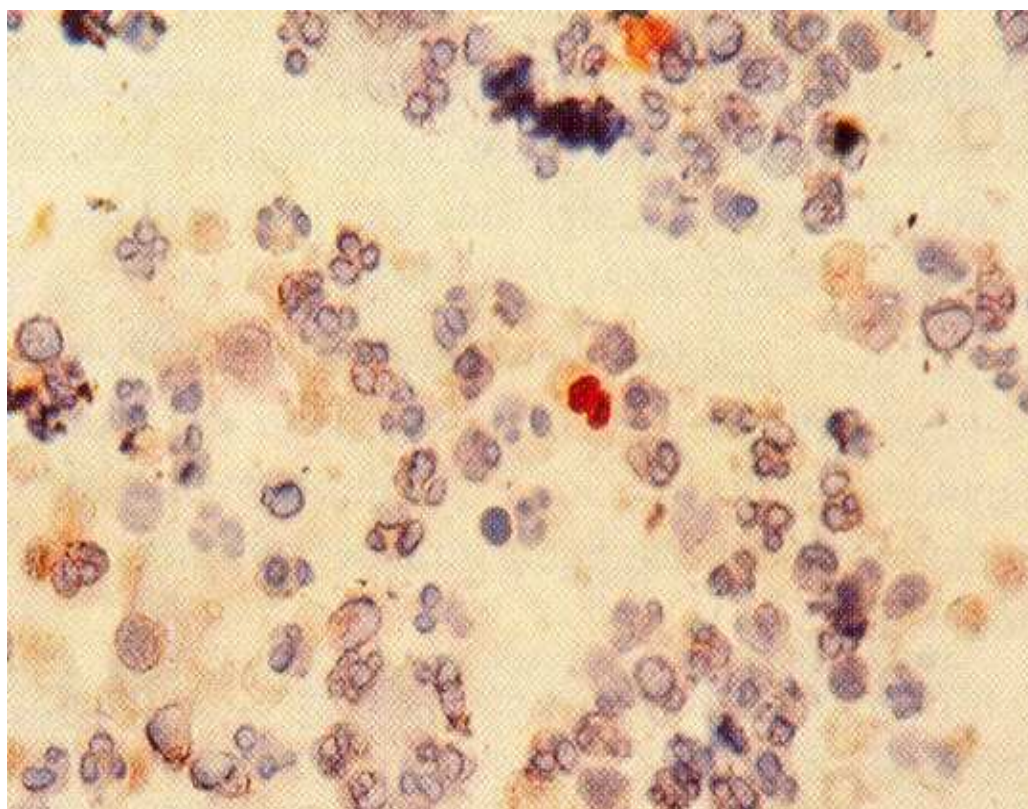


Figura 2: Técnica de antigenémia por imunoperoxidase, observando-se no centro o núcleo de um leucócito infectado de cor acastanhada.

### **Deteccção do genoma vírico**

A detecção do genoma vírico, sobretudo através de técnicas de amplificação do mesmo, constitui uma arma poderosa para o diagnóstico das infecções pelo CMV, tendo

vindo a ganhar terreno, nos últimos anos, relativamente às outras técnicas. São cada vez mais as aplicações das metodologias que utilizam este princípio em trabalhos científicos de investigação clínico-laboratorial e mesmo no diagnóstico de rotina (Smith e col., 2007).

De uma forma simples, podem dividir-se as técnicas mais divulgadas para o diagnóstico das infecções por CMV em técnicas que detectam o ácido desoxirribobucleico (ADN), como a PCR, o “Branched DNA Assay” e a “Hybrid Capture Assay”, e técnicas que detectam o ácido ribonucleico (ARN), como a “Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA) (Boeckh e col., 1998).

A PCR é uma técnica de detecção genómica que utiliza a amplificação do alvo inicial, recorrendo para isso a sequências iniciadoras específicas, os “primers”, e a sucessivos ciclos de desnaturação, hibridação e extensão. Tem, como principal vantagem, uma maior sensibilidade, o que permite melhorar a precocidade no diagnóstico, no caso de monitorização de doentes imunodeprimidos, ou a detecção do CMV em situações onde a baixa carga vírica não permite a detecção por outras técnicas de uma forma fiável, como no caso das encefalites (Shibata e col., 1988; Debiassi e col., 2004). Uma desvantagem que lhe era apontada, no caso dos doentes imunodeprimidos, era o seu baixo valor preditivo positivo, detectando baixas cargas víricas que não evoluíam para infecção sintomática (Patel e col., 1995). No entanto, o aparecimento de técnicas quantitativas permitiu que, à semelhança do que aconteceu com a técnica da antigenémia, se tentassem estabelecer valores de interpretação que aumentassem este valor preditivo (Meyer-Koenig e col., 2004). Desta forma, esta técnica tem vindo a substituir a técnica da antigenémia em muitos centros, devido aos motivos apontados anteriormente (possibilidade de armazenamento de amostras, aumento de sensibilidade e maior precisão). Também a possibilidade de contaminação geradora de resultados falsamente-positivos tem vindo a diminuir com a progressiva utilização de sistemas comerciais e das técnicas de PCR em tempo real (Burkardt, 2000; Kearns e col., 2001). Estas últimas, aliando a referida baixa probabilidade de contaminação, a rapidez e a simplicidade na execução, com a possibilidade de quantificação, são as técnicas que progressivamente estão a conquistar mais adeptos para o diagnóstico das infecções por CMV (Gouarin e col., 2007).

Pode dizer-se, resumidamente, que as técnicas de PCR reúnem boas condições para a sua utilização rotineira, quer em situações de utilização qualitativa, como em líquido



céfalo-raquidiano ou amniótico, ou em situações em que é requerida uma quantificação, como na monitorização de doentes submetidos a transplantação. Como principal desvantagem, deve ser mencionada a necessidade de correlacionar os valores quantitativos obtidos com uma determinada técnica da PCR com a clínica desenvolvida pelos doentes em cada tipo de transplantação, devido à variabilidade dos valores obtidos em diferentes situações (Allice e col., 2006; von Muller e col., 2007; Halwachs-Baumann, 2007).

Relativamente ao “Branched DNA Assay” e à “Hybrid Capture Assay”, deve ser referido que são técnicas de hibridização, sem amplificação do ADN alvo mas sim do sinal. Como principal vantagem deve ser mencionada a menor possibilidade de contaminação, uma vez que não se efectua a amplificação do ADN. Também a possibilidade de automação e de quantificação são factores favoráveis. Devem ser ainda referidas, mas como desvantagens, uma menor experiência na utilização destas metodologias, por comparação com as técnicas da PCR, embora existam versões comercializadas com estas técnicas, e a igual necessidade de estudos de correlação para cada tipo e equipa de transplantação, devido aos diferentes regimes de imunossupressão utilizados e aos condicionalismos próprios de cada transplantação (Grangeot-Keros e col., 2001).

Uma crítica comum aos métodos anteriormente descritos de detecção do ADN, será a de que a presença de ADN poderá não corresponder sempre a infecção activa no momento da sua detecção, uma vez que o ADN é estável e pode persistir nas células algum tempo após a fase de multiplicação activa. Este é o principal argumento usado pelos utilizadores da tecnologia NASBA para justificarem o uso rotineiro desta. Desta forma, a presença de ARN-mensageiro (ARN-m) do antigénio pp67 seria um melhor indicador de infecção activa, com as vantagens de esta ser mais específica na detecção precoce da infecção, evitando a “interpretação quantitativa” referida anteriormente para as técnicas de detecção de ADN. Também na monitorização do tratamento reflectiria melhor a multiplicação vírica e, assim, seria um melhor guia no seguimento destes doentes (Middeldorp e col., 2000). Estes últimos resultados não foram, no entanto, confirmados por outros autores (Gerna e col., 2003), além de que esta maior especificidade teria, como inconveniente, uma redução na sensibilidade nos doentes submetidos a transplantação (Mengoli e col., 2004; Lehto e col., 2005). Esta

sensibilidade poderia, todavia, ser melhorada se se recorresse à pesquisa do ARN-m para antígenos imediatamente precoces (Goossens e col., 1999; Gerna e col., 2003b).

Em resumo, as técnicas de detecção de ARN-m teriam, como principal vantagem, o facto de serem bons marcadores de infecções clinicamente significativas, mas a sua sensibilidade e o seu papel na monitorização terapêutica não parecem consensuais.

## **Serologia**

A pesquisa de anticorpos séricos tem duas aplicações principais: a determinação do estado imunitário (se existiu contacto prévio com o CMV) e no diagnóstico da infecção primária (Chou, 1990).

Relativamente à determinação do estado imunitário, ele é utilizado sobretudo em doentes submetidos a transplantação e nas mulheres grávidas. Nos primeiros, ele ajudará a definir grupos de risco nas determinações efectuadas imediatamente antes da transplantação, em particular a detecção de um dador positivo com um receptor negativo, que poderá originar uma infecção primária (Sagedal e col., 2005). Nas segundas, a ausência de anticorpos definirá o grupo de risco aumentado, relativamente à transmissão congénita do vírus, que são as grávidas susceptíveis de adquirir uma infecção primária (Fowler e col., 1992).

Para o diagnóstico da infecção primária, a seroconversão das IgG é uma forma simples e segura de o realizar. No entanto, esta nem sempre é possível de se detectar, particularmente nos rastreios da gravidez, dado que a maioria das infecções são assintomáticas. Nestes casos, a presença de IgM funcionará como um sinal de aviso de uma provável infecção aguda primária, devendo ser seguida de técnicas confirmatórias para esta infecção, como a técnica da avidéz das IgG ou a técnica de Western blot para as IgM (Lazzarotto e col., 1999).

Relativamente às técnicas de confirmação, a técnica da avidéz das IgG é, sem dúvida, a mais utilizada e mais estudada, contribuindo, de uma maneira decisiva, para diminuir a percentagem de resultados falsamente positivos dados pelos laboratórios. Ela baseia-se na produção de anticorpos com baixa avidéz ou afinidade funcional nas primeiras semanas da infecção primária, anticorpos esses que serão facilmente

removidos das suas ligações aos antigénicos citomegálicos, se se utilizar a ureia na primeira lavagem efectuada durante o ensaio imunoenzimático. Desta forma, na presença de anticorpos com índice de avidéz elevado, poderá excluir-se uma infecção primária recente (Blackburn e col., 1991; Grangeot-Keros e col., 1997). No que se refere à técnica de Western blot, esta revelou-se de alguma utilidade na confirmação dos soros com IgM positivas, sobretudo no contexto da gravidez e antes da vulgarização da técnica da avidéz (Paixão e col., 1998; Lazzarotto e col., 1998). A experiência com esta última levou a que a técnica de Western blot caísse em desuso (Macé e col., 2004; Lazzarotto – comunicação pessoal, 2006) ou que fosse remetida para uma segunda linha de confirmação, nos casos em que os soros para avidéz são colhidos para além das 12 semanas de gravidez (Paixão e col., 2002).

### **2.7.3 Diagnóstico laboratorial das infecções citomegálicas consoante os diferentes hospedeiros**

#### **Hospedeiros imunocompetentes**

O diagnóstico laboratorial nestes doentes repousa na serologia, ou seja, na pesquisa de anticorpos específicos para o CMV. Tal como referido anteriormente, a seroconversão das IgG é uma forma simples e segura de o realizar. Neste contexto, doentes imunocompetentes com síndrome mononucleósica ou outras manifestações clínicas que levarem a hipótese de infecção citomegálica, será fácil de comprovar a seroconversão uma vez que, ao contrário dos rastreios pré-natais, o doente encontra-se sintomático, o que permite a primeira colheita na fase inicial, antes da subida das IgG, seguida de uma segunda colheita duas semanas depois, quando a subida destas imunoglobulinas já se verificou (Drew, 1988).

No caso de o quadro clínico se arrastar e se não for possível documentar a seroconversão, a presença de IgM deverá ser confirmada pelos métodos referidos anteriormente, a avidéz das IgG ou o Western blot para a IgM (Lazzarotto e col., 1997).

Outras metodologias, como a pesquisa do vírus ou de componentes do mesmo, são habitualmente desnecessárias neste contexto, podendo inclusivamente, gerar resultados falsamente negativos, como as técnicas da cultura ou da antigenémia, ou falsamente positivos com a PCR, uma vez que esta técnica pode detectar o ADN do vírus até seis

meses após a infecção primária (Revello e col., 1998), para além do custo substancialmente mais elevado desta última, relativamente às técnicas serológicas.

### **Hospedeiros imunodeprimidos**

Como referido anteriormente, nestes doentes, a serologia tem um papel limitado, embora importante, ajudando a definir grupos de risco nas determinações efectuadas imediatamente antes da transplantação (Sagedal e col., 2005). Igualmente, no doente VIH positivo, a serologia terá interesse na avaliação inicial, para detectar os escassos doentes que serão seronegativos. Nestes, o acompanhamento serológico poderá ter utilidade, uma vez que, se se mantiver negativo, a hipótese de infecção por CMV perante alguma suspeita clínica, poderá ser eliminada (Tendero, 2001).

São as técnicas de detecção directa, a antigenémia ou as técnicas de biologia molecular, as escolhidas para o diagnóstico e monitorização da infecção citomegálica em doentes imunodeprimidos. A monitorização justifica-se nos doentes submetidos a transplantação, dado que a maioria das infecções se localiza num determinado período, os primeiros quatro meses após a transplantação. Esta monitorização permitirá a detecção precoce da infecção citomegálica, em muitos dos casos numa fase pré-sintomática da infecção, o que, por sua vez, poderá conduzir à denominada terapêutica “preemptive”, cujo objectivo é o de abortar a infecção antes da mesma se transformar em doença citomegálica (Nichols e col., 2000). Relativamente à monitorização do doente infectado pelo VIH, ela raramente é praticada, apesar de sugerida por alguns autores (Walmsley e col., 1998; Salmon-Céron e col., 2000). Tal facto poderá dever-se à dificuldade em definir períodos de risco acrescido da infecção citomegálica nestes doentes, ao contrário do que acontece na transplantação.

O diagnóstico da infecção por CMV, localizada em diferentes órgãos, obedece a critérios mais precisos do que o diagnóstico da infecção sistémica, atrás referido. Assim, dando como exemplo as localizações mais frequentemente mencionadas, pode-se dizer que as infecções do aparelho gastrointestinal e as hepatites requerem a utilização da biópsia, para detecção das lesões microscópicas no exame histológico ou imuno-histoquímico ou a detecção por cultura, sendo a detecção por PCR insuficiente para diagnóstico, enquanto que o atingimento do sistema nervoso central pode ser confirmado com uma cultura ou uma PCR do líquido céfalo-raquidiano, num doente

com clínica compatível. Já o caso da pneumonia, para além de requerer um quadro clínico compatível com a detecção das lesões microscópicas no exame histológico ou imuno-histoquímico das biopsias, ou a detecção por cultura nos lavados bronco-alveolares, também exige a exclusão de outros agentes patogénicos para se garantir o papel etiológico do CMV, o que dificulta o diagnóstico laboratorial desta infecção (Ljungman e col., 2002).

### **Diagnóstico da infecção congénita**

O diagnóstico da infecção congénita deve ser dividido em pré-natal e pós-natal, dado tratarem-se de abordagens completamente diferentes (Maine e col., 2001).

Relativamente ao diagnóstico pré-natal, a questão do rastreio tem sido alvo de opiniões contrárias, com defensores e atacantes a esgrimirem os seus argumentos (Lazzarotto e col., 1998; Grangeot-Keros e col., 1998), de que resulta que o rastreio é aplicado apenas por algumas equipas obstétricas e não de uma forma universal.

Independentemente de a aplicação não ser universal, a utilização do rastreio, que tem sofrido uma evolução ao longo dos últimos anos, obedece a algumas regras consensuais, que passaremos a expor (Revello e col., 2004; Lazzarotto e col., 2004):

- O rastreio é dirigido apenas à detecção das infecções primárias, dada a maior probabilidade de transmissão e lesão fetal nestes casos, para além das dificuldades técnicas de detecção das reactivações e reinfecções;
- O primeiro passo deverá incluir reacções serológicas, com pesquisa das IgM e IgG específicas;
- Tal como referido anteriormente, a seroconversão das IgG é a forma mais simples e segura de efectuar o diagnóstico de infecção primária;
- A presença de IgM deve funcionar como um sinal de aviso de uma provável infecção aguda primária, devendo ser seguida de técnicas confirmatórias para esta infecção, como a técnica da avidéz das IgG ou a técnica de Western blot para as IgM;
- No caso de se efectuar o diagnóstico de infecção primária, a melhor forma de se confirmar a transmissão vertical ao feto é através da pesquisa do vírus no líquido amniótico. Esta pesquisa deve ser efectuada a partir da 21<sup>a</sup> semana de gravidez e com um intervalo superior a 12 semanas, relativamente ao início da infecção primária

(embora raramente se consiga localizar o momento exacto em que esta se iniciou), e incluir cultura celular e técnicas de biologia molecular. Grávidas com alterações ecográficas não esclarecidas deverão também ser submetidas a amniocentese para detecção de CMV.

O diagnóstico pré-natal, quando segue estas indicações, costuma ser relatado como muito específico e com uma sensibilidade que pode ultrapassar 80% (Liesnard e col., 2000; Gouarin e col., 2002; Revello e col., 2004), não se confirmando os resultados de uma equipa (Guerra e col., 2000) que sugeriam que baixas cargas víricas no líquido amniótico, apenas detectáveis por PCR, poderiam ser eliminadas e não implicariam necessariamente que o feto estivesse infectado por CMV. A nossa experiência (Paixão e col., 2006), aponta também no sentido dos primeiros, ou seja, da excelente especificidade do diagnóstico pré-natal para o CMV, quando efectuado com a cultura e a PCR conjuntamente (ver capítulo “Diagnóstico pré-natal”).

Quanto ao diagnóstico pós-natal da infecção congénita, ele repousa na detecção do vírus nas três primeiras semanas de vida, de forma a garantir que a infecção foi adquirida antes do nascimento (Istas e col., 1995). Dada a excreção intensa do vírus através do aparelho urinário, a urina é o produto mais utilizado para esta detecção (Noyola e col., 2000), embora a saliva possa, igualmente, ser processada para este fim (Balcerek e col., 1993). A cultura mantém-se como o método de referência, embora a PCR tenha vindo a ser relatada como sensível e específica (Schlesinger e col., 2003; Nozawa e col., 2007), sendo esta, também, a nossa experiência (Paixão e col., 2005; ver capítulo “Estudo da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal”).

O diagnóstico da infecção congénita para além das três semanas de vida constituiu, até recentemente, um problema para os virologistas, uma vez que a detecção do vírus para além deste limite não permitia distinguir a infecção congénita da infecção perinatal, sendo esta distinção fundamental em termos de seguimento das crianças (ver capítulo “Apresentação clínica das infecções citomegálicas - Infecção congénita e perinatal”). A possibilidade de se utilizarem os cartões do diagnóstico precoce (também conhecidos como “Guthrie cards” ou, na sua designação não profissional, como “teste do pézinho”) para o diagnóstico tardio da infecção congénita pelo CMV, foi transmitida sobretudo em alguns dos trabalhos de uma equipa italiana (Barbi e col., 1996; Barbi e col., 2000; Barbi e col., 2006). Esta equipa verificou que o recurso a estes cartões com

técnicas de PCR permitiu, quando comparado com o método de referência, resultados com 100% de sensibilidade e 99% de especificidade, mesmo em cartões com vários anos de armazenamento nos institutos de genética. A nossa experiência nesta área, para fins epidemiológicos, é relatada no capítulo “Estudo da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal”, tendo sido igualmente utilizada esta metodologia para o diagnóstico de rotina em cartões solicitados por várias instituições pediátricas nacionais (Almeida e col., 2005). A utilização destes cartões foi também recentemente explorada por outras equipas, que obtiveram resultados promissores no que se refere ao valor preditivo da carga vírica no sangue do cartão para o aparecimento de sequelas tardias da infecção congénita (Vauloup-Fellous e col., 2007; Walter e col., 2007).

## **CAPÍTULO 3 – TRABALHO EXPERIMENTAL**



### **3.1 Estudo da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal**

#### **3.1.1 Objectivos**

- Determinação da sensibilidade e especificidade da pesquisa do ADN do CMV em “Guthrie cards” por uma técnica de *nested-PCR*.
- Determinação da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal através da detecção do ADN nos “Guthrie cards”.

#### **3.1.2 Material e métodos**

##### **1. Determinação da sensibilidade e especificidade da pesquisa do ADN do CMV em “Guthrie cards”.**

###### **a) Amostragem:**

- Determinação da sensibilidade: foram estudados 28 cartões provenientes de igual número de crianças com infecção congénita diagnosticada pelo método de referência (virúria detectada por cultura celular – método “shell-vial”, numa amostra colhida nas três primeiras semanas de vida).
- Determinação da especificidade: 280 cartões de crianças com virúria negativa para CMV numa amostra colhida nas três primeiras semanas de vida.

Em ambos os casos, as pesquisas de virúria foram efectuadas no Laboratório de Microbiologia do Hospital de Santa Cruz ou no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira. Os cartões foram enviados pelo IGMJM, após nossa solicitação e com autorização materna para a realização do teste. O tempo de permanência dos cartões no IGMJM variou entre um mês e oito anos, consoante o tempo que mediou entre a pesquisa de virúria de cada criança e o pedido do cartão para este estudo.

###### **b) Técnica de PCR para amplificação do ADN (figura 3):**

Esta técnica foi efectuada no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira.

- Extracção: eram cortados três pedaços de cada cartão, cada pedaço correspondente a 1/6 da área total de um dos círculos do “Guthrie card”. Os três pedaços eram colocados

em três tubos de PCR de 200µL, conjuntamente com 45µL de “Minimal Essential Medium” (MEM). O cartão era deixado em contacto com o MEM durante um dia e no dia seguinte procedia-se à extracção do ADN por choque térmico (aquecimento do tubo a 56°C durante 60 minutos, seguido de 99°C durante sete minutos). Após centrifugação, o sobrenadante era separado e congelado a -80°C até ao dia seguinte.

-Amplificação: no 3º dia efectuava-se a amplificação do ADN do CMV, utilizando uma técnica de *nested-PCR* que amplifica uma região do gene gp58 (Wakefield e col., 1992), utilizando-se o termociclador “PCR express thermal cycler” (Hybaid).

Primeira amplificação: 5 µl de cada extracto eram colocados numa mistura contendo 5µl de tampão da PCR (200mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTP's, 1U Taq ADN Polymerase (Invitrogen) e 0.25µM de cada um dos primers externos (gB1-5'GAG GAC AAC GAA ATC CTG TTG GGC A e gB2- 5'GTC GAC GGT GGA GAT ACT GCT GAG G), para um volume final de 50µl.

A mistura era submetida a uma desnaturação durante dois minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos compostos de uma desnaturação de 30 segundos a 94°C, hibridação a 55°C durante 30 segundos, seguidos de uma extensão a 72°C durante 30 segundos. O último ciclo era seguido de uma extensão final a 72°C, durante cinco minutos.

Segunda amplificação: 1µl do produto amplificado na primeira série de ciclos foi submetido a uma segunda amplificação, sendo utilizados um par de primers internos (gB3-5'ACC ACC GCA CTG AGG AAT GTC AG e gB4-5'TCA ATC ATG CGT TTG AAG AGG TA). Esta amplificação difere da primeira, uma vez que foram aplicados 30 ciclos, a temperatura de hibridação foi de 53°C e a concentração de primers foi de 0.5µM.

- Detecção: os produtos da *nested-PCR* foram separados por electroforese num gel com 3% de agarose, contendo brometo de etídio e analisados à luz ultra-violeta.

- Interpretação dos resultados: um cartão foi considerado como “negativo” sempre que não se tenha verificado amplificação em nenhuma das três alíquotas. A amplificação em uma ou mais alíquotas, implicava a repetição do processo com novas extracções em mais três pedaços de cartão. Os critérios de “positivo” ou “negativo” após as repetições serão discutidos em “Resultados”.

- Medidas de controlo por sessão de PCR: como controlo positivo eram utilizadas duas concentrações diferentes da estirpe AD-169 e como controlo negativo eram utilizados quatro tubos em que se substituíu o extraído por água destilada.

A sensibilidade desta técnica tinha sido previamente estudada (resultados não apresentados), tendo-se verificado que, comparativamente com a cultura shell-vial, era capaz de detectar o genoma do CMV de uma suspensão da estirpe laboratorial AD-169, diluída a  $10^{-2}$ , que produzia quatro focos infecciosos/ml (ou seja, a sensibilidade foi de 0.04 focos infecciosos/ml. O termo “focos infecciosos” refere-se à visualização dos núcleos fluorescentes positivos, sendo cada núcleo contado como um “foco infeccioso”). No decurso deste estudo, a sensibilidade foi novamente estudada, utilizando uma suspensão de AD-169 com concentração conhecida (ver capítulo “Diagnóstico da infecção congénita citomegálica através da detecção do ADN viral em *pools* de amostras de urina”) e verificou-se que detectava até uma diluição que continha 900 cópias/mL.

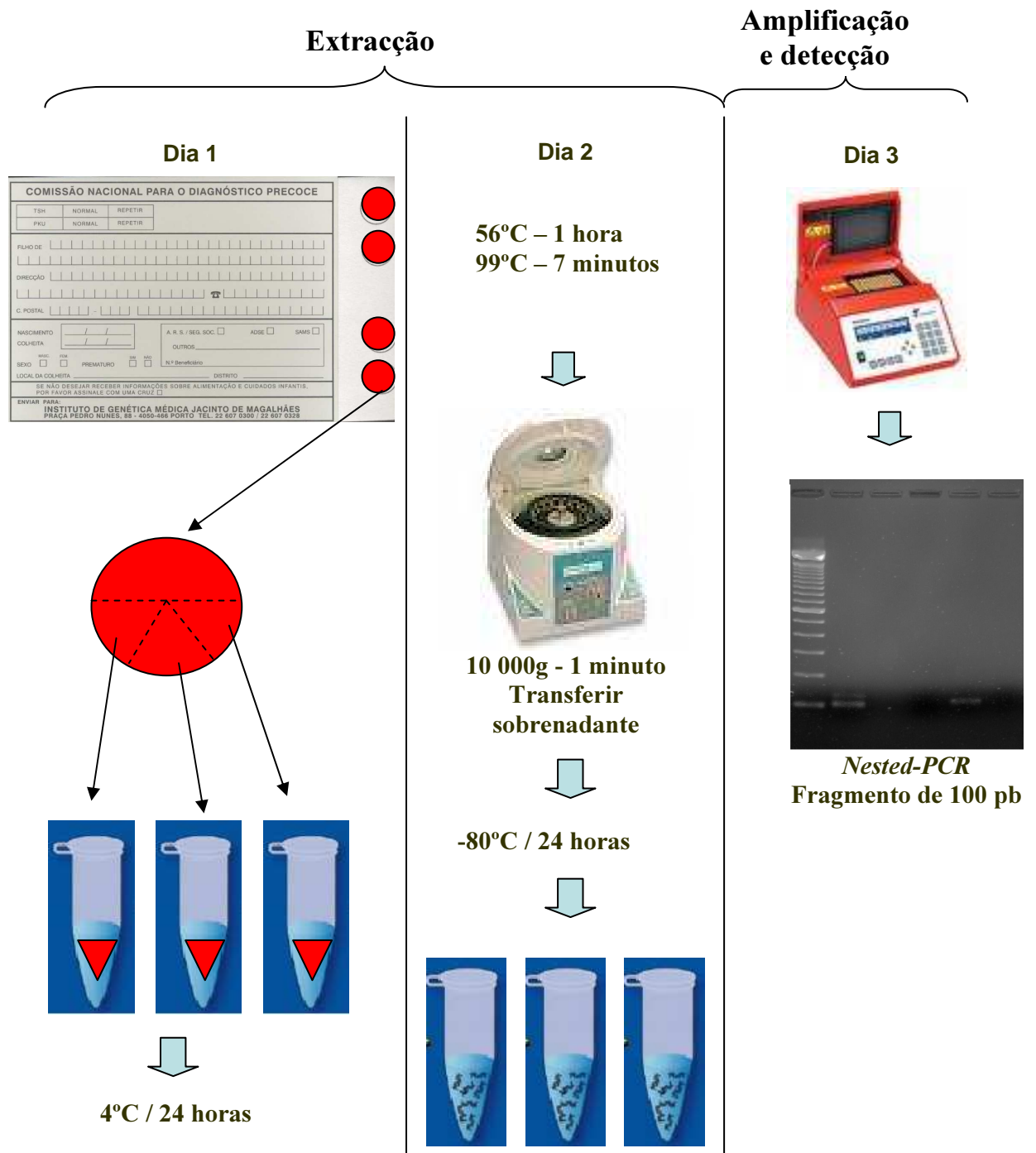


Figura 3: Resumo dos principais passos da técnica de PCR utilizada para detecção do ADN do CMV nos “Guthrie cards”.

## **2. Determinação da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal.**

a) Amostragem: foram estudados 3600 “Guthrie cards”, colhidos de igual número de recém-nascidos entre Agosto de 2003 e Setembro de 2004, e que tinham sido enviados para o IGMJM no âmbito do programa nacional de diagnóstico precoce. Estes 3600 cartões foram seleccionados de todo o território nacional (continente e ilhas), de uma forma proporcional ao número de nascimentos em cada distrito (de acordo com os dados fornecidos pelo próprio IGMJM, referentes ao ano anterior ao do início do estudo. Como exemplo, se um distrito registou 7% do número total de nascimentos em Portugal em 2002, este distrito contribuiu com 7% dos cartões para este estudo) (tabela 2). Dentro de cada distrito, o IGMJM escolheu aleatoriamente os cartões.

Os cartões foram enviados anonimamente pelo IGMJM, identificados apenas com uma numeração de série criada para o efeito, para o Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira.

Este estudo foi previamente aprovado pela Comissão Nacional de Protecção de Dados.

b) Técnica de PCR para amplificação do ADN: foi utilizada a mesma técnica descrita em 1-b), que foi igualmente efectuada no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira.

### **3.1.3 Resultados**

#### **1. Determinação da sensibilidade e especificidade da pesquisa do ADN do CMV em “Guthrie cards”:**

- Especificidade: dos 280 cartões de crianças com virúria negativa, 267 tiveram as três alíquotas negativas e 13 cartões tiveram uma alíquota positiva. Destes últimos, a repetição não confirmou a alíquota positiva, ou seja, num total de seis alíquotas testadas, nunca um cartão negativo deu mais de uma alíquota positiva. Assim, o critério de positividade de um cartão foi definido como tendo  $\geq 2/6$  alíquotas positivas. Com este critério, a especificidade da técnica, na amostragem estudada, foi de 100%.

- Sensibilidade: dos cartões estudados de crianças com virúria positiva, 26 em 28 foram positivos de acordo com os critérios definidos na alínea anterior ( $\geq 2/6$  alíquotas positivas), o que corresponde a uma sensibilidade de 93%.

## 2) Determinação da prevalência da infeção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal:

Dos 3600 cartões estudados, 38 foram positivos, segundo os critérios determinados no ponto anterior, o que dá uma prevalência de 1.05% (intervalo de confiança para 95%: 0.748-1.446). Os resultados obtidos em cada distrito estão expressos na tabela 2.

Tabela 2. Distribuição por distrito dos cartões estudados e respectivo número de positivos.

| <b>Distrito</b> | <b>Nº nados-vivos em 2002</b> | <b>Cartões estudados</b> | <b>Cartões positivos</b> |
|-----------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| V. do Castelo   | 2236                          | 71                       | 1                        |
| Braga           | 9789                          | 309                      | 4                        |
| Vila Real       | 1898                          | 60                       | 2                        |
| Bragança        | 1024                          | 32                       | 0                        |
| Porto           | 22118                         | 699                      | 5                        |
| Aveiro          | 7219                          | 228                      | 1                        |
| Viseu           | 3650                          | 115                      | 1                        |
| Guarda          | 1293                          | 41                       | 3                        |
| Coimbra         | 4791                          | 151                      | 2                        |
| Açores          | 3065                          | 97                       | 1                        |
| Madeira         | 3103                          | 98                       | 2                        |
| Leiria          | 4643                          | 147                      | 1                        |
| Setúbal         | 8891                          | 281                      | 4                        |
| Lisboa          | 26205                         | 828                      | 5                        |
| C. Branco       | 1542                          | 49                       | 0                        |
| Santarém        | 4184                          | 132                      | 3                        |
| Beja            | 1218                          | 38                       | 1                        |
| Portalegre      | 940                           | 30                       | 0                        |
| Évora           | 1691                          | 53                       | 2                        |
| Faro            | 4387                          | 139                      | 0                        |
| <b>Total</b>    | <b>113887</b>                 | <b>3600</b>              | <b>38</b>                |

### 3.1.4 Discussão

Neste estudo, foi determinada, pela primeira vez a nível nacional, a prevalência da infecção congénita mais frequente nos países mais desenvolvidos, a infecção pelo CMV. Que seja do nosso conhecimento, este estudo foi, também, o primeiro a utilizar os “Guthrie cards” para um estudo da prevalência da infecção congénita por CMV ao nível de todo um país, utilizando uma amostragem proporcional ao número de nascimentos por distrito, embora uma equipa italiana tenha utilizado esta técnica para um estudo multicêntrico e, com ele, tentado estimar a prevalência desta infecção em Itália (Barbi e col., 2006).

Ao optar-se pela utilização dos cartões para este estudo, a vantagem, já referida na “Introdução” deste capítulo, seria a de permitir uma amostragem mais representativa da população de recém-nascidos portugueses, vantagem essa que se procurou atingir com o estudo dos 3600 cartões, colhidos da forma anteriormente descrita.

No entanto, a utilização desta metodologia suscita alguns comentários:

- A sensibilidade e a especificidade da pesquisa do ADN nos “Guthrie cards” poderão não ser idênticas ao método de referência, a pesquisa de virúria por cultura celular nas primeiras três semanas de vida. A técnica por nós adoptada para a pesquisa do ADN nos cartões, foi descrita por uma equipa italiana como tendo uma sensibilidade de 100% mas uma especificidade de 99% (Barbi e col., 2000). Se a sensibilidade atinge um valor inultrapassável, a especificidade tem um resultado que, embora aparentemente excelente, invalida a sua utilização em estudos de prevalência quando a mesma se estima que tenha valores baixos. Assim, com uma especificidade de 99%, é de prever que em cada 100 cartões estudados teríamos um cartão falsamente positivo; mas sendo a prevalência esperada de cerca de 1%, isso significaria que em cada 100 cartões estudados, teríamos dois positivos: um verdadeiro positivo, devido a esta prevalência de 1%, e um falso-positivo, devido à especificidade de 99%. Desta forma, este valor preditivo positivo de 50% torna-se inaceitável nestas situações de baixa prevalência, embora não invalide a utilização desta técnica, com estes critérios, em situações de prevalência mais elevada. Como exemplo, a aplicação em estudos de surdez, em que a prevalência esperada será de pelo menos 20% (Barbi e col., 2003; Almeida e col., 2005), significará que o valor preditivo positivo estará acima dos 95%, pelo que esta técnica tem indicação para esta situação ou outras similares.

No nosso estudo inicial, para a determinação da sensibilidade e especificidade da pesquisa do ADN do CMV em “Guthrie cards”, verificámos que os cartões negativos tiveram sempre  $\leq 1/6$  alíquotas positivas; assim, optámos por estabelecer como critério de positividade, um cartão ter  $\geq 2/6$  alíquotas positivas, de forma a assegurarmos a especificidade de 100%, essencial para a segunda fase do estudo em que trabalharíamos com uma prevalência que se previa perto de 1%. Ao elevarmos o limiar de positividade para melhorar a especificidade, arriscámo-nos a sofrer a contrapartida de termos cartões positivos com  $\leq 1/6$  alíquotas positivas, o que efectivamente veio a acontecer com dois cartões, baixando a sensibilidade para 93%, mas mantendo um valor preditivo negativo perto de 99%. Em suma, a adopção deste critério permitiu avançar para a segunda fase do estudo com uma técnica menos sensível mas mais específica, o que nos pareceu mais adequado para esta situação. Deve, no entanto, ser referido que a especificidade de 100% foi obtida com o estudo de 280 cartões, pelo que a possibilidade de se detectar algum resultado falsamente positivo, caso um maior número de cartões tivesse sido estudado, não pode ser excluída.

- Contaminação: esta pode acontecer na fase pré-analítica ou na fase analítica. No que se refere a esta última fase, a probabilidade de acontecer uma contaminação será idêntica à do processamento de qualquer produto biológico e inerente à utilização de uma técnica manual de *nested-PCR*, em que a abertura do tubo após a primeira amplificação aumenta a probabilidade de contaminação com aerossóis contendo amplicões (Borst e col., 2004).

Relativamente à fase pré-analítica, tem sido colocada a questão se um cartão positivo poderá contaminar os cartões adjacentes, durante o envio para o laboratório de genética que vai proceder ao diagnóstico precoce ou durante o armazenamento neste laboratório. Esta contaminação é, no entanto, referida como fraca (Johansson e col., 1997) ou mesmo inexistente (Maria Barbi, comunicação pessoal). Admitimos que esta contaminação, se existir, poderá, juntamente com eventuais contaminações na fase analítica, ajudar a explicar os casos de cartões de crianças com virúria negativa e que tiveram uma alíquota positiva (1/6).

No que se refere aos resultados obtidos, a prevalência de 1.05% situa-se entre o intervalo habitualmente citado na literatura (Revello, 2004), mas com valores ligeiramente acima dos últimos apresentados por equipas europeias (Schlesinger e col. 2005, Naessens e col., 2005; Barbi e col., 2006). Se considerarmos que a sensibilidade



do método terá sido de 93%, como no estudo preliminar, a prevalência não subirá significativamente, mantendo-se no valor arredondado de 1.1%. Isto significa que, para cerca de 110.000 nado-vivos que nascerão por ano em Portugal, 1210 terão infecção congénita por CMV. Deve ser referido, no entanto, que o intervalo de confiança para 95%, 0.73-1.38, implica uma variação significativa nesta estimativa, embora este intervalo seja claramente mais estreito do que o retirado da literatura, 0.2 a 2.2% (Revello, 2004). Diminuir o intervalo de confiança do presente estudo significaria ter aumentado a amostragem, o que se tornou inviável por restrições de índole económica, uma vez que, apesar de este trabalho ter beneficiado de um financiamento significativo, ele implicou a realização de aproximadamente 13000 reacções individuais de nested-PCR (cada cartão implicava três reacções, se fosse negativo, seis no caso de pelo menos uma das primeiras três alíquotas ser positiva). Segundo uma meta-análise recente (Kenneson e col., 2007), apenas 13 estudos publicados utilizaram uma amostragem superior à do presente estudo para determinação da prevalência da infecção congénita e, destes, somente cinco foram efectuados na Europa.

Deve ainda ser acrescentado que Portugal tem uma elevada seroprevalência para o CMV nas mulheres em idade reprodutiva, 75.5% e 81.5%, respectivamente para as idades compreendidas entre os 20-29 e os 30-44 anos (Lopo e col., 2004), o que, segundo uma meta-análise (Kenneson e col., 2007), seria o factor que isoladamente seria mais relevante para um aumento da prevalência da infecção congénita, contribuindo com 29% da variação obtida na prevalência da infecção em recém-nascidos. Esta análise estima ainda que, tal como referido anteriormente, um aumento em 10% na seroprevalência resultaria num aumento, aparentemente paradoxal, de 0.26% na prevalência da infecção congénita detectada nos recém-nascidos. Este facto ajudaria, assim, a explicar a prevalência mais elevada no nosso país, relativamente a outros países europeus com taxas de seroprevalência mais baixas (Schlesinger e col. 2005, Naessens e col., 2005), mas não relativamente a países de taxa idêntica, como a Itália (Barbi e col., 2006).

Se os dados anteriores permitem uma estimativa mais precisa do número de crianças nascidas no nosso país com infecção congénita, o número destas que virá a apresentar uma infecção sintomática ao nascimento, com as consequências potencialmente mais graves que lhe são atribuídas, não foi possível determinar neste estudo, uma vez que este exigia o anonimato das crianças estudadas. Assim, apenas por extrapolação de

trabalhos publicados noutros países poderemos estimar quer o número de crianças com infecção sintomática quer o número de crianças com infecção assintomática ao nascimento mas que poderão desenvolver as sequelas tardias, nomeadamente a surdez.

Desta forma, anualmente em Portugal, cerca de 133 recém-nascidos apresentarão infecção congénita sintomática ao nascimento, da qual cerca de 90% ficarão com sequelas importantes (Gouarin e col., 2002; Kenneson e col., 2007), ou seja, 120. Aproximadamente 1077 terão infecção assintomática neste mesmo período, das quais cinco a 15% (Lazarotto e col., 1999) poderão vir a sofrer de sequelas importantes, nomeadamente surdez sensorineural ou atraso mental, do que resultam 54 a 162 crianças nesta situação. Tomando em conjunto estes dados, poderemos estimar que, em cada ano no nosso país, entre 174 (120+54) e 282 (120+162) crianças irão sofrer sequelas importantes devido à infecção congénita citomegálica.

Em suma, este trabalho permite estimar, pela primeira vez no nosso país e baseando-se num estudo com uma amostragem significativa, a prevalência da principal infecção congénita, a infecção pelo CMV. Os resultados observados colocam o nosso país dentro do intervalo esperado, mas com valores acima dos apresentados recentemente por outras equipas europeias. A determinação das causas desta diferença deverá ser assunto de futura investigação nesta área, devendo esta passar, em primeiro lugar, pelo estudo da contribuição relativa das infecções primárias e das secundárias no número total de infecções congénitas. Poderemos referir, a este propósito, que um projecto de investigação iniciado recentemente e com o apoio da Unidade de Vigilância Pediátrica da Sociedade Portuguesa de Pediatria (“Infecção congénita pelo vírus citomegálico humano (CMV)”) tem, como objectivos, para além do registo do número de casos de infecção congénita detectados no nosso país e da respectiva comparação com as estimativas efectuadas a partir de outros estudos (como o relatado no capítulo “Estudo da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal”), avaliar a contribuição relativa das infecções primárias e das secundárias no número total de infecções congénitas. Após dois anos e meio do projecto, com 26 notificações, das quais 10 e três foram devidas, respectivamente, a casos de infecções primária e recorrente (11 casos sem informação materna conclusiva), não é possível, por enquanto, retirar conclusões relativamente a este ponto.

Nota: o estudo da prevalência a nível nacional fez parte do projecto “Estudo da prevalência da infecção congénita por CMV em Portugal”, que recebeu financiamento através do FEDER, no âmbito do programa Saúde XXI. Este projecto foi coordenado pelo Departamento de Química da Universidade da Beira Interior e efectuado em colaboração com o Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira, tendo este último sido o responsável pela determinação da prevalência com o recurso aos Guthrie cards.

### **3.2 Diagnóstico pré-natal da infecção citomegálica.**

#### **3.2.1. Objectivos**

- Diagnóstico serológico: determinar o poder discriminativo da técnica da avidéz das IgG para as infecções primárias recentes.
- Diagnóstico da infecção fetal: avaliar a utilidade das diferentes metodologias na selecção das grávidas para amniocentese e determinar a sensibilidade e especificidade da detecção do CMV no líquido amniótico no diagnóstico da infecção congénita.

#### **3.2.2. Diagnóstico serológico**

##### **3.2.2.1. Material e métodos**

Amostras: um total de 144 amostras foi utilizado neste estudo, de acordo com o seguinte esquema:

Grupo A: 27 amostras provenientes de doentes com infecções primárias confirmadas (seroconversão para as IgG), com menos de quatro meses de evolução. Destas amostras, 16 provieram de 11 doentes imunocompetentes e as outras 11 de oito doentes submetidos a transplantação;

Grupo B: 117 amostras provenientes de indivíduos em que se excluiu infecção primária recente. Destas, quatro provieram de dois doentes transplantados com infecção primária entre quatro e 10 meses antes da colheita, 16 provieram de 16 doentes transplantados com infecção recorrente por CMV, 20 de igual número de dadores de sangue com Western Blot (WB) para IgM negativo, 47 de igual número de grávidas com WB para IgM negativo e 30 de grávidas com resultados anteriores positivos para IgG (seropositivas para IgG com mais de quatro meses).

Técnica de WB:

Foi utilizado um *kit* comercial (HCMV IgM Blot 3.0; Genelabs Diagnostics) que detecta IgM contra o CMV por intermédio de uma técnica de WB. Os antígenos de

CMV utilizados nesta técnica são proteínas estruturais (pp38, pp150) e não estruturais (pp52), obtidas por engenharia genética.

Os critérios utilizados para a interpretação dos resultados obtidos com esta técnica estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3: Critérios de interpretação da técnica de WB.

| <b>Bandas reactivas</b> | <b>Interpretação</b> | <b>Indicações diagnósticas</b>   |
|-------------------------|----------------------|--|
| <b>P52 + p 38</b>       | <b>Positivo</b>      | <b>Infecção primária</b>   |
| <b>P52 + p150</b>       | <b>Positivo</b>      | <b>Se p52 &gt; p150: Infecção primária<br/>Se p52 &lt; p150: Infecção recorrente</b> |
| <b>P52 só</b>           | <b>Duvidoso</b>      | <b>Possível inf. primária: repetir no prazo de 10 a 30 dias</b>                      |
| <b>P38 e/ou P150</b>    | <b>Negativo</b>      | <b>Negativo</b>  |

Técnica de avidéz:

A técnica de avidéz das IgG ensaiada neste estudo foi a técnica comercial “VIDAS CMV IgG avidity –BioMérieux” (CMVU). Esta técnica mede a avidéz utilizando dois testes do *kit* comercial “VIDAS CMV IgG”, em que o primeiro teste serve de referência e que no segundo deve substituir-se o tampão de lavagem pelo tampão de ureia, de forma a testar a força de ligação antígeno-anticorpo. O princípio do doseamento associa o método imunoenzimático a uma detecção final em fluorescência, medida num equipamento semi-automatizado (VIDAS), sendo esta metodologia conhecida como *Enzyme linked fluorescent assay* (ELFA). O índice de avidéz é definido como sendo a relação do RFV (Relative Fluorescence Value): relação entre o valor obtido no teste com a lavagem com o tampão de ureia e o valor RFV obtido no teste de referência. Esta relação exprime a percentagem de anticorpos que resistem à dissociação do antígeno durante a lavagem com a ureia, de forma que quando a percentagem é baixa (avidéz baixa), ela sugere infecção recente (ver capítulo “O diagnóstico laboratorial das infecções citomegálicas”).

### 3.2.2.2 Resultados

Os resultados obtidos com a técnica CMVU estão ilustrados no Gráfico 1 e resumidos na Tabela 4. Como se pode verificar, houve uma separação total entre os dois grupos: os soros provenientes dos doentes com infecção primária recente apresentaram sempre índices de avidéz inferiores a 0,6, enquanto que os soros dos doentes com infecções antigas (quer se tratem de infecções recorrentes ou de infecções primárias com mais de quatro meses de evolução), apresentaram sempre índices de avidéz superiores a 0,6.

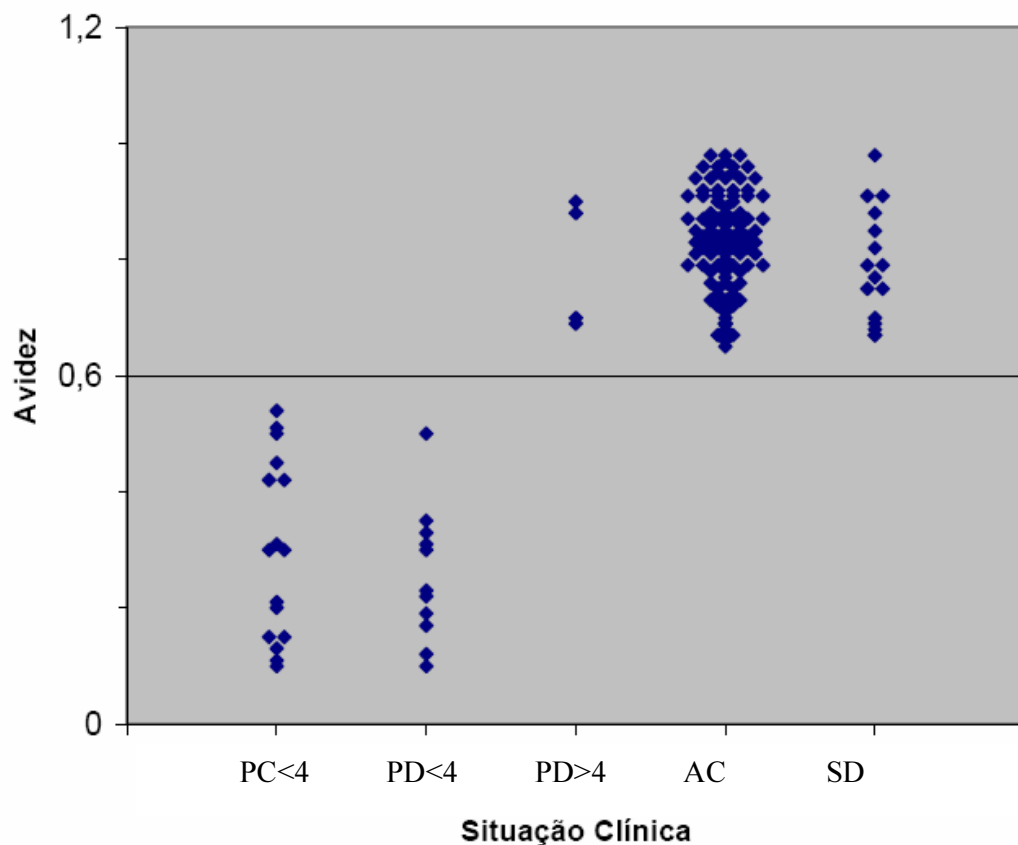


Gráfico 1: Resultados do teste da avidéz consoante a situação clínica.

- PC<4 – Infecção Primária com < 4 meses de evolução (pacientes imunocompetentes)
- PD<4 – Infecção Primária com < 4 meses de evolução (pacientes imunodeprimidos)
- PD>4 – Infecção Primária com > 4 meses de evolução (pacientes imunodeprimidos)
- AC – Infecção antiga (pacientes imunocompetentes)
- RD – Infecção recorrente (pacientes imunodeprimidos)

Tabela 4: Resultados do teste da avidéz consoante a situação clínica. Nas colunas do meio e da direita, estão representados os números de soros testados e entre parêntesis o número de doentes.

|  | Índice de avidéz <0,6 | Índice de avidéz > 0,6 |
|--|-----------------------|------------------------|
| Soros de infecção primária com <4 meses de evolução (pacientes imunocompetentes) | 16 (13 doentes)       | 0                      |
| Soros de infecção primária com <4 meses de evolução (pacientes imunodeprimidos)  | 11 (11 doentes)       | 0                      |
| Soros de infecção antiga (pacientes imunodeprimidos)                             | 0                     | 97 (97 doentes)        |
| Soros de infecção secundária (pacientes imunodeprimidos)                         | 0                     | 16 (16 doentes)        |
| Soros de infecção primária com > 4 meses de evolução (pacientes imunodeprimidos) | 0                     | 4 (2 doentes)          |

No Gráfico 2 estão representadas as alterações temporais da avidéz, no decurso dos quatro meses iniciais de evolução de cinco das infecções primárias recentes, nas quais foi possível colher mais que uma amostra.

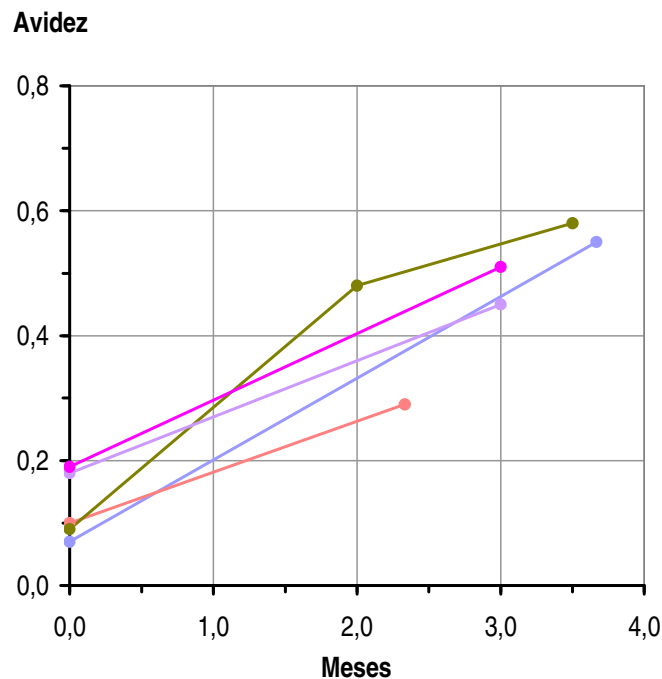


Gráfico 2: Evolução da avidéz em cinco infecções primárias.

### **3.2.3. Diagnóstico da infecção fetal**

#### **3.2.3.1. Material e métodos**

- População estudada: foram submetidas a amniocentese 751 grávidas de várias instituições obstétricas portuguesas. As instituições que colaboraram regularmente com um dos laboratórios abaixo referidos, quer no envio de produtos biológicos para análise quer das respectivas informações clínicas, laboratoriais e ecográficas, foram: Maternidade Alfredo da Costa, Maternidade Júlio Dinis, Maternidade Bissaya Barreto, Centro de Genética Clínica do Porto, Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães, Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia, Centro Hospitalar Cova da Beira, Hospital Conde de S. Bento e Hospital Geral de S. António.

As indicações para amniocentese foram agrupadas da seguinte forma: IgM positiva, com índice de avidéz <0.6; IgM positiva, com índice de avidéz 0.6-0.8; IgM positiva, com índice de avidéz <0.8 (sem informação discriminada do intervalo em que se situou o resultado); IgM positiva, com WB positivo; IgM positiva, com WB negativo; IgM positiva, sem confirmação; seroconversão das IgG; alterações ecográficas; sem dados laboratoriais e/ou ecográficos.

- Laboratórios envolvidos no estudo: Laboratório de Microbiologia do Hospital de Santa Cruz (HSC:1994-2008), Secção de virologia do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB: 2001-2004) e Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM:2004-2008).

- Métodos serológicos:

1) Rastreio das IgM e determinações das IgG: foram efectuados nos laboratórios das instituições obstétricas onde as grávidas foram seguidas, tendo sido utilizados diferentes ensaios imunoenzimáticos comerciais.

2) Métodos confirmatórios:

a) Testes da avidéz das IgG: foram efectuados nos laboratórios das instituições obstétricas onde as grávidas foram seguidas, tendo sido utilizada sempre a mesma técnica comercial (CMVU).

b) WB: nos dois únicos laboratórios que a efectuaram (HSC e CHCB), foi utilizada a mesma técnica comercial, descrita anteriormente (HCMV IgM Blot 3.0; Genelabs



Diagnostics). Só foram considerados como “positivos por WB” os soros com um padrão sugestivo de infecção primária.

- Pesquisa do CMV nos líquidos amnióticos:

Estudaram-se 757 líquidos amnióticos (12 corresponderam a gravidezes gemelares), enviados pelas diferentes instituições obstétricas. Destes, 365 foram analisados no HSC entre 1994 e 2004 (cultura + PCR), 231 no CHCB entre 2001 e 2004 (cultura+PCR) e 161 simultaneamente no HSC (cultura) e na FCM (PCR) entre 2004 e 2008.

Culturas víricas: os líquidos amnióticos foram estudados pela técnica “shell-vial” em culturas celulares na linha MRC-5. O procedimento foi idêntico no HSC e no CHCB, únicos laboratórios que efectuaram as culturas (HSC: 1994-2008; CHCB: 2001-2004).

Polymerase chain reaction (PCR):

a) HSC: entre 1994-1998 as amostras foram enviadas para processamento para o Hospital Erasme, onde foram utilizadas duas técnicas de *nested*-PCR (dirigidas para zonas localizadas nas regiões que codificam o IE1 e a p150). Entre 1998 e até 2004, foi utilizada uma técnica comercial (Amplicor CMV technique, Roche diagnostics. Amplifica uma zona do gene da polimerase do DNA).

b) FCM: a partir de 2004 e até ao final do estudo foi utilizada a técnica de *nested*-PCR referida nos capítulos “Estudo da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal” e “Diagnóstico da infecção congénita citomegálica através da detecção do ADN viral em *pools* de amostras de urina”.

c) CHCB: foi utilizada a técnica comercial anteriormente referida (Amplicor CMV technique; Roche diagnostics).

- Pesquisa do CMV nos recém-nascidos e fetos:

Para avaliação da sensibilidade e da especificidade, os resultados das amniocenteses foram comparados com os métodos de referência para o diagnóstico da infecção congénita, a virúria no recém-nascido (avaliado em 125 casos) e com a pesquisa de CMV em tecidos fetais (avaliado em 6 casos).

As urinas foram estudadas pela técnica “shell-vial” em culturas celulares na linha MRC-5. O procedimento foi idêntico em ambos laboratórios.

Os estudos anátomo-patológicos dos tecidos fetais foram efectuados nos laboratórios de Anatomia Patológica das instituições obstétricas.

- Pesquisa de CMV nos cartões do diagnóstico precoce:

Foi utilizado o procedimento descrito no capítulo “Estudo da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal” (efectuado no CHCB).

- Análise estatística:

As diferenças na distribuição das amniocenteses positivas pelas diferentes indicações foram analisadas utilizando os testes exacto de Fisher e do quiquadrado.

### 3.2.3.2. Resultados

Dos 757 líquidos amnióticos estudados, 48 foram positivos para CMV, 43 dos quais pelas duas técnicas (“shell-vial” e PCR), quatro apenas por PCR e um exclusivamente pela técnica “shell-vial”.

A sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo negativo e o valor preditivo positivo do diagnóstico pré-natal (quando comparadas com os métodos de referência, a virúria no recém-nascido e a pesquisa de inclusões no feto – tabela 5) foram, respectivamente, de 91,7%, 99,1%, 98,1% e 95,7%.

Tabela 5: Comparação entre os resultados obtidos com o diagnóstico pré-natal e os métodos de referência (virúria no recém-nascido ou detecção histológica nos tecidos fetais).

|                         | Virúria + | virúria - | Feto positivo | Feto negativo | Total |
|-------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-------|
| <b>amniocentese + *</b> | 16        | 1         | 6             | 0             | 23    |
| <b>amniocentese -</b>   | 2         | 106       | 0             | 0             | 108   |
| <b>Total</b>            | 18        | 107       | 6             | 0             | 131   |

\* shell-vial e PCR positivos

A distribuição dos resultados, de acordo com a informação laboratorial e ecográfica recebida das instituições obstétricas, está indicada na tabela 6. Na tabela 7 estão discriminadas as indicações ecográficas para as amniocenteses que foram efectuadas entre 2004 e 2008. Pode verificar-se que a indicação que registou uma percentagem mais elevada de amniocenteses positivas foi “IgM positiva, com índice de avidéz <0.6”, seguida de “seroconversão das IgG”, as únicas com valores superiores a 10%.

Tabela 6: Distribuição dos resultados positivos, de acordo com a informação laboratorial e ecográfica recebida das instituições obstétricas.

| <b>Indicação para amniocentese</b>                 | <b>Amniocentese: positivas/total (%)</b> |
|--|--|
| <b>IgM positiva, com índice de avidéz &lt;0.6</b>  | 8/32 (25%)                               |
| <b>seroconversão das IgG</b>                       | 2/13 (15%)                               |
| <b>alterações ecográficas</b>                      | 13/159 (8%)                              |
| <b>IgM positiva, com WB positivo</b>               | 8/108 (7%)                               |
| <b>sem dados laboratoriais e/ou ecográficos</b>    | 10/200 (5%)                              |
| <b>IgM positiva, sem confirmação</b>               | 7/192 (4%)                               |
| <b>IgM positiva, com índice de avidéz 0.6-0.8</b>  | 0/23 (0%)                                |
| <b>IgM positiva, com índice de avidéz &gt;0.8</b>  | 0/2 (0%)                                 |
| <b>IgM positiva, com WB negativo</b>               | 0/12 (0%)                                |
| <b>IgM positiva, com índice de avidéz &lt;0.8*</b> | 0/18 (0%)                                |
| <b>TOTAL</b>                                       | 48/757 (6%)                              |

\*a informação recebida não discriminava se o índice de avidéz era inferior a 0.6 ou entre 0.6 e 0.8

Tabela 7: Distribuição dos resultados positivos, de acordo com a informação ecográfica recebida das instituições obstétricas entre 2004 e 2008.

| <b>Alteração ecográfica</b>                | <b>Amniocentese: positivas/total</b> |
|--|--------------------------------------|
| <b>Atraso de crescimento intra-uterino</b> | 1/7                                  |
| <b>Alterações múltiplas</b>                | 1/3                                  |
| <b>Ascite</b>                              | 1/1                                  |
| <b>Calcificações cerebrais</b>             | 0/1                                  |
| <b>Espessamento placenta</b>               | 0/3                                  |
| <b>Hidramnios</b>                          | 0/1                                  |
| <b>Hidrocefalia</b>                        | 0/1                                  |
| <b>Hidropsia</b>                           | 0/1                                  |
| <b>Intestino hiperecogénico</b>            | 0/1                                  |
| <b>Microcefalia</b>                        | 0/1                                  |
| <b>Rins hiperecogénicos</b>                | 0/1                                  |
| <b>Ventriculomegália</b>                   | 1/25                                 |
| <b>Não especificadas</b>                   | 1/3                                  |
| <b>TOTAL</b>                               | 5/49                                 |

Com o objectivo de determinar se existiam diferenças significativas entre as taxas de positividade das amniocenteses, quando estas eram divididas consoante as indicações para a sua realização, foram aplicados os testes estatísticos do quiquadrado e o exacto de Fisher (tabela 8):

Tabela 8: Comparação estatística entre os resultados obtidos com as amniocenteses, divididos de acordo com as principais indicações para este exame.

| <b>Indicações para amniocentese</b>   | <b>Teste</b>     | <b>Nível de significância</b> | <b>Interpretação</b> |
|---|------------------|-------------------------------|----------------------|
| <b>IgM positiva, com índice de avidéz &lt;0.6 / IgM positiva, sem confirmação</b>               | Quiquadrado      | p<0.0001                      | Significativo        |
| <b>IgM positiva, com índice de avidéz &lt;0.6 / IgM positiva, com índice de avidéz 0.6-0.8</b>  | Exacto de Fisher | p=0.015                       | Significativo        |
| <b>IgM positiva, com índice de avidéz &lt;0.6 / IgM positiva, com índice de avidéz &gt;0.6*</b> | Exacto de Fisher | p=0.007                       | Significativo        |
| <b>IgM positiva, com índice de avidéz &lt;0.6 / seroconversão das IgG</b>                       | Exacto de Fisher | p=0.698                       | Não significativo    |
| <b>IgM positiva, com índice de avidéz &lt;0.6 / alterações ecográficas</b>                      | Exacto de Fisher | p=0.013                       | Significativo        |
| <b>IgM positiva, com índice de avidéz &lt;0.6 / IgM positiva, com WB positivo</b>               | Quiquadrado      | p=0.015                       | Significativo        |
| <b>IgM positiva, com WB positivo / IgM positiva, sem confirmação</b>                            | Quiquadrado      | p=0.247                       | Não significativo    |

\*O grupo “IgM positiva, com índice de avidéz >0.6” inclui os grupos “IgM positiva, com índice de avidéz 0.6-0.8” e “IgM positiva, com índice de avidéz >0.8”.

Seguidamente foram determinadas as sensibilidades, especificidades e os valores preditivos, relativamente à detecção da infecção fetal no líquido amniótico, dos métodos de confirmação das IgM: avidéz das IgG (tabela 9) e WB para as IgM (tabela 10).

Tabela 9: Tabela utilizada para os cálculos da sensibilidade, especificidade e valores preditivos negativo e positivo dos resultados com índice de avidéz <0.6, tomando como referência o resultado da amniocentese. Estes foram, respectivamente, de 100%, 51%, 100% e 25%.

|                                    | <b>IgM positiva, com<br/>índice de avidéz &lt;0.6</b> | <b>IgM positiva, com<br/>índice de avidéz &gt;0.6</b> | <b>Total</b> |
|------------------------------------|---|---|--------------|
| <b>Amniocenteses<br/>positivas</b> | 8   | 0   | 8            |
| <b>Amniocenteses<br/>negativas</b> | 24  | 25  | 49           |
| <b>Total</b>                       | 32  | 25  | 57           |

Tabela 10: Tabela utilizada para os cálculos da sensibilidade, especificidade e valores preditivos negativo e positivo dos resultados com WB positivo, tomando como referência o resultado da amniocentese. Estes foram, respectivamente, de 100%, 11%, 100% e 7%.

|                                    | <b>WB positivo</b> | <b>WB negativo</b> | <b>Total</b> |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| <b>Amniocenteses<br/>positivas</b> | 8                  | 0                  | 8            |
| <b>Amniocenteses<br/>negativas</b> | 100                | 12                 | 112          |
| <b>Total</b>                       | 108                | 12                 | 120          |

Foram igualmente comparadas as percentagens de positividade das amniocenteses, divididas consoante o tempo de gestação em que as mesmas foram efectuadas (de 2004 a 2008). Os resultados são apresentados na tabela 11, tendo-se verificado que o teste do quiquadrado não revelou diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos antes e depois da 21ª semana.

Tabela 11: distribuição dos resultados positivos entre 2004 e 2008, consoante a altura da gestação em que as mesmas foram efectuadas.

| <b>Tempo de gestação</b>                        | <b>Amniocenteses:<br/>Positivas/total (%)</b> |
|---|---|
| <b>Colheita depois da 21<sup>a</sup> semana</b> | 14/112 (12.5%)                                |
| <b>Colheita antes da 21<sup>a</sup> semana</b>  | 1/18 (5.6%)                                   |
| <b>Sem informação do período de gestação</b>    | 3/31 (9.8%)                                   |

### 3.2.3.2. Discussão

Tal como referido no capítulo “O diagnóstico laboratorial das infecções citomegálicas”, o diagnóstico definitivo de uma infecção primária por CMV deverá ser efectuado através da constatação de uma seroconversão para as IgG entre duas amostras seriadas. No entanto, esta nem sempre é possível demonstrar, por ser frequente a ausência de dados laboratoriais anteriores à gravidez, pelo que a suspeita de infecção primária coloca-se, em muitas situações, devido à presença de IgM numa primeira amostra colhida já durante a gravidez. A pesquisa de IgM para o CMV não permite a distinção entre os dois tipos de infecção, primária e recorrente. Embora a sua presença seja mais frequente na infecção primária, estas imunoglobulinas podem aparecer na infecção recorrente e, de uma forma inespecífica, como resultado de outras situações infecciosas, pelo que, perante uma IgM positiva, deve-se, obrigatoriamente, recorrer a métodos confirmatórios, sendo a técnica da avidéz para as IgG e o WB para as IgM os mais utilizados (Lazzarotto e col., 1999).

A técnica da avidéz das IgG é a mais utilizada para a confirmação de uma infecção recente. Dentro das vantagens inerentes à realização desta técnica conta-se o facto de estar comercializada, sob uma forma semi-automatizada, num equipamento facilmente disponível nos laboratórios de rotina (Baccard e col., 2001) e de a interpretação ser mais simples que a interpretação visual da técnica de WB para as IgM. Relativamente à primeira vantagem, deve ser referido que existem vários *kits* comercializados, para execução manual de técnicas de imunoensaio para a determinação da avidéz das IgG, mas o reagente ensaiado neste trabalho é, sem dúvida o mais utilizado, razão pela qual foi objecto de avaliação neste estudo.

O primeiro objectivo deste trabalho, ligado ao diagnóstico serológico, foi o de estudar a possibilidade desta técnica distinguir as infecções primárias recentes (com menos de quatro meses de evolução) de outras situações ligadas à infecção pelo CMV, nomeadamente as infecções “antigas” (com mais de quatro meses de evolução) e as infecções recorrentes, com o objectivo de tentar estabelecer um limiar que pudesse separar a primeira das restantes situações. Esta distinção torna-se prioritária no contexto da gravidez, onde a infecção primária se acompanha de uma taxa de transmissão bastante mais elevada que a infecção recorrente, pelo que o diagnóstico serológico pré-natal centra-se na detecção da primeira (Guerra e col., 2000).

Os resultados obtidos sugerem que o limiar de 0,6 separa as infecções primárias recentes (com menos de quatro meses de evolução) das restantes infecções (primárias com mais de quatro meses de evolução e infecções recorrentes). Estes resultados foram obtidos independentemente do facto de se tratar de doentes imunocompetentes ou imunodeprimidos, o que poderá revestir-se de algum interesse, uma vez que eles sugerem que este teste também poderá ser utilizado para exclusão da infecção primária numa grávida imunodeprimida. Assim, perante um resultado com um índice de avidade superior a 0,6, a exclusão de uma infecção primária recente poderá ser feita com razoável segurança, evitando-se, na grávida, o recurso à amniocentese para detectar a transmissão vertical do vírus. Os dados obtidos na segunda fase do presente trabalho e que serão comentados mais à frente, são igualmente a favor da utilização do limiar de 0,6 para selecção das grávidas para amniocentese.

Relativamente à revisão do diagnóstico da infecção fetal, algumas ilações poderão ser retiradas.

Foram estudados 757 líquidos amnióticos e revistas as respectivas indicações para amniocentese. O facto de o líquido amniótico ter sido o único produto estudado deve-se à descrição, na literatura, da superioridade deste produto, em termos de sensibilidade, relativamente ao sangue fetal (Liesnard e col., 2000).

No que se refere à sensibilidade, especificidade e valores preditivos negativo e positivo do diagnóstico virológico pré-natal, eles foram, respectivamente, de 91,7%, 99,1%, 98,1% e 95,7% nesta revisão. Apesar de terem sido calculados com base em 131 amniocenteses (apenas nestes casos foi possível comparar com os métodos de referência para o diagnóstico da infecção congénita, a virúria do recém-nascido ou o exame

anátomo-patológico do feto), estes números não se afastam do descrito na literatura internacional, o que se deve, provavelmente, ao facto de ter sido adoptada a metodologia recomendada a nível internacional, nomeadamente a utilização simultânea da cultura e da PCR (Revello e col., 2004). A utilização simultânea da cultura e da PCR aumentou ligeiramente a sensibilidade relativamente à utilização isolada de apenas uma das técnicas (48 líquidos amnióticos positivos: 43 pelas duas técnicas; 4 e 1, respectivamente por PCR e cultura isoladamente). No que se refere à recomendação da colheita a partir da 21<sup>a</sup> semana (Revello e col., 2004), os resultados obtidos sugerem que a sensibilidade pode efectivamente aumentar quando se segue esta recomendação, verificando-se um aumento na percentagem de amniocenteses positivas de 5,6% para 12,5% quando se passa respectivamente das colheitas antes para depois da 21<sup>a</sup> semana. No entanto, este trabalho não pode confirmar a importância desta recomendação, uma vez que a diferença entre estes valores não foi estatisticamente significativa.

Relativamente à especificidade, é importante ser referido que o único caso falsamente positivo aqui relatado (líquido amniótico positivo por cultura e PCR com virúria negativa no recém-nascido), veio posteriormente a revelar-se como um verdadeiro positivo através da análise do cartão para o diagnóstico precoce, o Guthrie card. A pesquisa por PCR foi positiva para CMV no cartão desta criança, dando a entender que neste caso, com o líquido amniótico positivo por duas técnicas e com o cartão do recém-nascido positivo por uma técnica que nas nossas mãos teve resultados de especificidade de 100% (ver capítulo “Estudo da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal”), devemos estar perante um falso negativo para a virúria do recém-nascido. Esta situação, pouco frequente, pode surgir sobretudo por condições deficientes de transporte e conservação da amostra até ao seu processamento, uma vez que o vírus é lábil à temperatura ambiente, pelo que a não refrigeração correcta poderá originar um resultado falsamente negativo. Assim, durante todo este período de revisão, não houve qualquer resultado laboratorial falsamente positivo no diagnóstico pré-natal, pelo que o facto de a especificidade ser aqui relatada como sendo de 99% e não de 100%, deve-se apenas ao facto de as técnicas de referência serem a virúria e a pesquisa de inclusões nos tecidos fetais, ficando assim assegurado aos obstetras que um resultado positivo correspondeu sempre a um feto infectado por este vírus, o que está de acordo com a literatura (Revello e col., 2004; Azam e col., 2001).



Analisando os métodos utilizados pelas equipas para seleccionarem as grávidas para amniocentese, verificamos que nos primeiros anos desta revisão, esta selecção baseava-se sobretudo na presença de uma IgM para o CMV. Como os métodos de confirmação desta IgM ainda não estavam disponíveis, o que só veio a acontecer em 1997, a grande maioria das amniocenteses efectuadas entre 1994 e 1997 tiveram, assim, como indicação exclusiva, a presença de IgM sem qualquer método de confirmação das mesmas, em grávidas sem informação prévia à gestação. Os resultados mostram uma percentagem relativamente baixa de líquidos amnióticos positivos para CMV neste grupo, reflexo provável do número de resultados falsamente positivos que as técnicas serológicas para as IgM, com especificidade variável, originam se não tiverem confirmação posterior (Lazarotto e col., 1992; Weber e col., 1994). Os valores semelhantes obtidos no grupo “sem dados laboratoriais e/ou ecográficos” reflectem, provavelmente, o mesmo problema, uma vez que presumimos que a grande maioria destes casos fora igualmente originados pela presença de IgM positivas sem confirmação; no entanto, a ausência de informação não permite a avaliação correcta deste grupo.

A importância da confirmação das IgM está patente quando se faz a comparação entre os resultados positivos obtidos com os grupos “IgM positiva, com índice de avidéz <0.6” e “IgM positiva, sem confirmação”, tendo sido observada uma diferença estatisticamente significativa. Não se observaram diferenças entre “IgM positiva, com WB positivo” e “IgM positiva, sem confirmação” (respectivamente com 7% e 4% de amniocenteses positivas), o que, conjuntamente com a diferença significativa verificada entre “IgM positiva, com índice de avidéz <0.6” e “IgM positiva, com WB positivo” (respectivamente com 25% e 7% de amniocenteses positivas) sugere fortemente que o melhor método de confirmação das IgM é o teste da avidéz das IgG. Ainda relativamente a este teste, interessava avaliar se o limiar sugerido na primeira parte deste trabalho, o índice de avidéz 0,6, seria igualmente discriminativo, no que se refere à selecção das grávidas para amniocentese. As comparações efectuadas entre o grupo “IgM positiva, com índice de avidéz <0.6” e os grupos “IgM positiva, com índice de avidéz 0.6-0.8” e “IgM positiva, com índice de avidéz >0.6” (este último incluindo os grupos “IgM positiva, com índice de avidéz 0.6-0.8” e “IgM positiva, com índice de avidéz >0.8”), reforçam a ideia de que este limiar poderá ser utilizado para este fim. Os resultados obtidos nesta revisão mostram, ainda, que a sensibilidade do critério “IgM

positiva, com índice de avidéz  $<0.6$ ”, no que se refere à detecção do vírus no líquido amniótico, foi de 100%, assegurando, assim, um valor preditivo negativo de 100%, sem resultados falsamente negativos. Estes resultados também foram obtidos com a técnica de WB, mas os valores preditivos positivos das duas técnicas de confirmação são significativamente diferentes (respectivamente 25% e 7%). Poderá parecer estranha a especificidade obtida com as duas técnicas, sobretudo com a avidéz (51%), o que parece contradizer o excelente desempenho desta técnica, que foi referido anteriormente. No entanto, deve ser reforçado que a técnica da avidéz identifica serologicamente as infecções primárias e que apenas uma percentagem destas tem como consequência a transmissão vertical; por isso, ao avaliarmos a especificidade tendo como referência os resultados do líquido amniótico, será natural que esta seja afectada por este motivo, o que não compromete o papel da avidéz, sobretudo utilizando o limiar aqui proposto, como excelente marcador serológico materno.

Deve ser referido, no entanto, que esta discriminação com o limiar situado no índice de avidéz de 0,6, nem sempre consegue ser tão definitiva como neste trabalho. Uma equipa francesa (Baccard-Longere e col., 2001), recorrendo a um número mais elevado de amostras (416 no total), verificou que cerca de 4% dos doentes com infecção primária recente tinham índices de avidéz superiores a 0,6. Embora seja uma probabilidade baixa, este facto levou a que se aceitasse como limiar de exclusão da infecção primária recente o índice de 0,8 (recomendação do reagente comercial CMVU); este limiar assegura, efectivamente, que não é excluída nenhuma infecção primária recente, mas tem como inconveniente que, também baseado nesta publicação, cerca de 18% dos soros de infecção antiga vão ter índices inferiores a este limiar e, como tal, erradamente interpretados como de infecção recente. Esta medida terá, como consequência no contexto da gravidez, um acréscimo de amniocenteses desnecessárias, com os eventuais riscos inerentes a esta atitude, nomeadamente a perda fetal, que ronda 1% dos actos (Revello e col., 2004), ou seja, segundo este protocolo que utiliza o limiar de 0,8, a probabilidade de perda fetal desnecessária, numa população de grávidas com infecção antiga, será de 0,18%. Como comparação, teremos de avaliar o risco de não detectar algumas infecções primárias recentes, se utilizarmos o limiar de 0,6: se seguirmos os dados da equipa francesa anteriormente referidos, teríamos 4% de falsos-negativos, ou seja, infecções primárias recentes com índices superiores a 0,6 e, como tal, não detectadas e encaminhadas para amniocentese; 30% destes 4% poderiam

transmitir o CMV aos seus fetos, o que dá cerca de 1,2%; destes, cerca de 20 a 25% iriam sofrer sequelas importantes, ou seja, 0,24 a 0,3% da população inicial de grávidas com infecção primária poderão ter uma criança com sequelas. Em resumo, a opção por qualquer um dos limiares comporta alguns riscos, embora mínimos: o limiar de 0,6 não detectará, dentro do universo das grávidas com infecção primária recente, cerca de 0,3% dessas grávidas que irão ter filhos com sequelas importantes, enquanto a opção pelo limiar 0,8 implicará que cerca de 18% das grávidas com IgM positiva mas com infecção antiga serão submetidas a um acto invasivo desnecessário e que 0,18% deste mesmo grupo irá ter perda fetal iatrogénica. Na nossa opinião, a primeira opção será, no estado actual do conhecimento, a mais indicada, uma vez que não implica um exame invasivo desnecessário a um grupo significativo de grávidas e, por outro lado, a ligeira perda de sensibilidade será diluída quando se adicionam os falsos negativos inerentes à pesquisa do vírus no líquido amniótico, cerca de 10%, como acima referido.

Relativamente a este último ponto, devemos ainda referir que a Sociedade Portuguesa de Virologia tem, na sua secção dedicada ao diagnóstico pré-natal, recomendações de um grupo, do qual somos o coordenador e que engloba virologistas, obstetras e pediatras. Nessas recomendações podemos ver que este grupo sugere a realização de um teste de WB para IgM nos casos de avidez “intermédia” (0.6 a 0.8), de forma a decidir a realização da amniocentese. Esta recomendação baseou-se na experiência de algumas equipas, nomeadamente da equipa do Hospital de Santa Cruz, que verificou que em cerca de metade destes casos de avidez “intermédia” o WB era negativo e, assim, reforçava-se a ideia de que não teria havido infecção recente por CMV, evitando com segurança acrescida a amniocentese. No entanto, na outra metade de casos, sendo o WB positivo, fica a dúvida se se tratará de um falso-positivo para WB ou de um falso-negativo para a avidez (avidez “intermédia” no caso de uma infecção recente). Os resultados apresentados nesta dissertação sugerem a primeira situação (falso-positivo para IgM), mas entendemos que, por precaução e até a observação de mais trabalhos publicados sobre a matéria, a recomendação de uma associação científica como a Sociedade Portuguesa de Virologia, de se efectuar a amniocentese nos casos de avidez 0.6-0.8 com WB positivo, deva ser seguida.

A comparação “IgM positiva, com índice de avidez  $<0.6$ ” com a “seroconversão das IgG” não resultou em diferença significativa, o que está de acordo com o esperado, dado

que estas duas estratégias são os melhores marcadores de infecção primária recente (ver capítulo “O diagnóstico laboratorial das infecções citomegálicas”).

A indicação de “Alterações ecográficas” originou 8% de amniocentese positivas. Também aqui a comparação deste grupo com o grupo “IgM positiva, com índice de avidéz <0.6” demonstrou diferença estatisticamente significativa, revelando que a avidéz proporciona um melhor rastreio para amniocentese que as alterações ecográficas. No entanto, esta situação difere das anteriores, uma vez que essas eram despoletadas por um rastreio serológico dirigido para o CMV, enquanto que o rastreio ecográfico tem como alvo a detecção de alterações morfológicas, independentemente desta etiologia específica. Assim, apesar da baixa percentagem de líquidos amnióticos positivos observada neste grupo, ela não é desprezível, pelo que a pesquisa do CMV tem, a nosso ver, todo o sentido de se efectuar, devendo fazer parte de um leque de parâmetros a pesquisar, no sentido do esclarecimento das alterações ecográficas verificadas. O levantamento mais detalhado dessas alterações, obtido no período de 2004 a 2008, pretendia correlacionar alguma alteração específica com a infecção intra-uterina citomegálica, mas o baixo número de positivos neste sub-grupo não o permitiu.

Em suma, os resultados apresentados nesta revisão sugerem que o diagnóstico pré-natal virológico para o CMV, efectuado segundo as metodologias aqui descritas, constitui uma arma diagnóstica fiável para a avaliação pré-natal desta infecção congénita. A selecção dos casos para amniocentese deve obedecer às indicações de “seroconversão para IgG”, “IgM confirmada” (devendo o método de confirmação ser a avidéz das IgG com um índice <0,6) e as alterações ecográficas de etiologia não esclarecida.

### **3.3 Diagnóstico da infecção congénita citomegálica através da detecção do ADN vírico em *pools* de amostras de urina**

#### **3.3.1 Objectivos**

- Demonstrar que o princípio utilizado em alguns bancos de sangue, o recurso a *pools* de amostras de sangue com o objectivo de reduzir significativamente os custos e tempos de execução, pode ser aplicado ao diagnóstico da infecção congénita por CMV, através da pesquisa do vírus, por técnicas de biologia molecular, em *pools* de urinas.
- Demonstrar que esta detecção poderá ser efectuada igualmente por uma técnica clássica de PCR (*nested*-PCR) e por uma técnica de PCR em tempo real.

#### **3.3.2 Material e métodos**

1) Critérios para definição de infecção congénita (sintomática e assintomática) e perinatal (adaptados de Demmler, 1991):

a) Infecção congénita sintomática – detecção de CMV na urina através do método de cultura “shell-vial”, durante as três primeiras semanas de vida, num recém-nascido com um ou mais dos seguintes sinais, sintomas ou alterações de exames laboratoriais:

- Baixo peso para a idade gestacional,
- Petéquias ou púrpura
- Esplenomegália
- Hepatomegália
- Icterícia ao nascimento
- Microcefalia
- Coriorretinite
- Alterações neurológicas não esclarecidas
- Calcificações intra-cranianas
- Alterações na audição
- Trombocitopénia ( $<75000/\text{mm}^3$ )
- Aumento da alanina aminotransferase
- Exclusão da rubéola e toxoplasmose congénita

b) Infecção congénita assintomática – detecção de CMV na urina através do método de cultura “shell-vial”, durante as três primeiras semanas de vida, num recém-nascido sem os sinais, sintomas ou alterações laboratoriais descritos anteriormente.

c) Infecção perinatal – detecção de CMV na urina através do método de cultura “shell-vial”, após as três primeiras semanas de vida, e com um teste de PCR negativo no sangue do “Guthrie card”, colhido na primeira semana de vida (teste efectuado no Centro Hospitalar Cova da Beira, de acordo com a metodologia descrita por Barbi e col., 2000).

2) Amostras: tal como referido no capítulo “Introdução”, este estudo foi dividido em três fases.

- Fase 1: as amostras de urina (74 no total) foram testadas isoladamente pela técnica de *nested*-PCR e comparadas com a cultura vírica. Esta primeira fase incluiu ainda experiências de cruzamentos (misturar uma amostra positiva com 19 negativas) para testar a capacidade do método de detectar uma única amostra positiva numa *pool* de 20 amostras.

Todas as amostras foram testadas individualmente pela técnica de *nested*-PCR e, posteriormente, pela mesma técnica após a sua junção a uma *pool*.

- Fase 2: a metodologia das *pools* foi ensaiada com todas as amostras de urina de crianças recebidas no Centro Hospitalar Cova da Beira para o diagnóstico de infecção por CMV, durante um período de 14 meses (Janeiro de 2002 e Março de 2003. Total de 180 amostras, com *pools* de 20 amostras cada). As *pools* positivas seguiram o algoritmo descrito na figura 4:

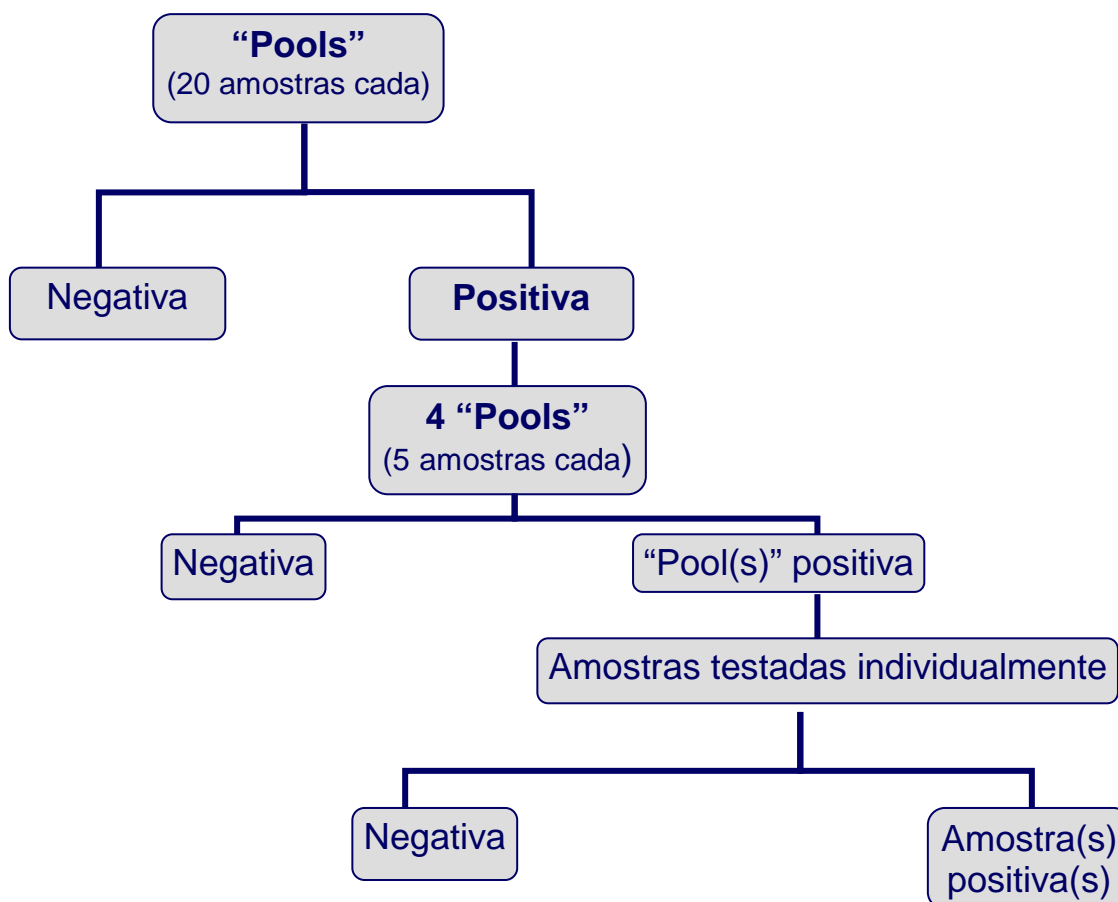


Figura 4. Algoritmo para a detecção de amostras positivas em *pools* de 20 amostras de urina. Todas as urinas de recém-nascidos recebidas no laboratório para diagnóstico de infecção congénita por CMV, foram divididas em *pools* de 20 amostras e testadas pela técnica da nested-PCR. Quando positiva, as 20 amostras eram divididas em quatro *pools* de cinco amostras cada e a *pool* positiva era testada individualmente. Este algoritmo foi utilizado nas fases 2 e 3 do estudo.

- Fase 3: a metodologia das *pools* foi ensaiada com uma técnica de PCR em tempo real em oito das nove *pools* da fase 2. Foram ainda testadas cinco novas *pools* negativas, cada uma constituída por 20 urinas negativas. As *pools* positivas seguiram o algoritmo descrito na figura 4. Nesta fase foram ainda efectuados ensaios para pesquisa de inibidores da PCR, quer nas amostras individuais destas *pools*, quer nas *pools* negativas.

A componente laboratorial da primeira e da segunda fase deste estudo foi efectuada no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira, tendo a terceira fase sido executada no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa, com excepção da cultura das 100 amostras de urina utilizadas para as cinco *pools* negativas.

Todas as amostras (total das três fases: 354) foram colhidas em crianças com suspeita de infecção por CMV, com idades compreendidas entre um e 365 dias de vida, das quais 340as três primeiras semanas de vida.

Todas as amostras utilizadas nas três fases do estudo tiveram o mesmo procedimento inicial: foram divididas em duas alíquotas imediatamente após a recepção no laboratório, tendo uma delas sido mantida a 4°C e processada individualmente pelo método de cultura “shell-vial”, nas primeiras 24 horas após a recepção, enquanto a outra foi congelada a -80°C.

Na fase 2, as amostras congeladas já não foram testadas individualmente por *nested*-PCR, uma vez que a comparação entre a cultura “shell-vial” e a *nested*-PCR em amostras individuais já tinha sido efectuada na primeira fase. Assim, para além da cultura aplicada individualmente, estas amostras apenas foram testadas pela *nested*-PCR após a sua inclusão nas *pools* de 20 amostras, segundo o algoritmo apresentado.

As *pools* e as amostras ensaiadas na fase 3 foram enviadas congeladas para o Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas, para processamento por uma técnica de PCR em tempo real.

#### Preparação e processamento das *pools*

A preparação das *pools* foi idêntica nas fases 1 e 2. As amostras de urina que tinham sido congeladas a -80°C imediatamente após a recepção, foram descongeladas no dia da extracção e as *pools* preparadas misturando 10µL de cada amostra, de acordo com o esquema seguidamente referido.

Na fase 1 do estudo, três *pools* constituídas por 19 amostras negativas (cultura e PCR negativas) foram testadas isoladamente. Em seguida, cada *pool* foi testada com uma amostra positiva de cada vez, num total de 17 amostras, totalizando assim, 51 cruzamentos testados pela técnica de *nested*-PCR.



Na fase 2, as amostras que chegavam ao laboratório de virologia do Centro Hospitalar Cova da Beira eram divididas, por ordem de chegada, em grupos de 20 amostras. Posteriormente foram descongeladas e de cada grupo foi preparada uma *pool* para seguidamente ser testada pela técnica de *nested*-PCR, segundo o algoritmo descrito na figura 4.

Na fase 3, as *pools* e as amostras individuais recebidas do Centro Hospitalar Cova da Beira, foram descongeladas no dia da execução e processadas imediatamente.

#### Métodos virológicos:

1) Culturas virais: as culturas “shell-vial” em células MRC-5 foram efectuadas no laboratório de virologia do Centro Hospitalar Cova da Beira. O processamento e inoculação das amostras nestas culturas, foram efectuadas de acordo com procedimentos previamente descritos (Gleaves e col., 1985) com pequenas modificações.

Resumidamente, as culturas foram inoculadas com 250µL de amostra de urina previamente tratada com uma mistura de antibióticos. Após centrifugação durante 45 minutos a 700g, o inóculo foi retirado e adicionou-se 1ml de Optimem com 5% de soro bovino fetal. Após 48 horas de incubação, o meio foi retirado e a monocamada fixada com metanol. Seguiu-se uma técnica de imunofluorescência indirecta que utilizou como anticorpos monoclonais específicos, para antígenos imediatamente precoces e antígenos precoces, a pool anti-CMV “I.E.A.+E.A.” e um conjugado com FITC (Argene). As lamelas com as monocamadas coradas foram observadas em microscópio de fluorescência, procurando-se as típicas imagens de núcleos fluorescentes nas células infectadas.

#### 2) Técnica da *nested*-PCR:

O método de extracção do ADN do CMV, assim como a técnica da *nested*-PCR, foram os mesmos, quer para as amostras isoladas quer para as *pools*, tendo sido adaptados de uma técnica previamente descrita, (Barbi e col., 1996). O motivo da escolha destas técnicas deveu-se ao facto da experiência anterior com esta técnica (era a técnica utilizada por rotina no laboratório de virologia do Centro Hospitalar Cova da

Beira) e por ser consideravelmente mais económica que as técnicas comerciais disponíveis.

- Extracção:

- 50µl de cada amostra eram aquecidos a 56°C durante uma hora.
- Seguiu-se um aquecimento a 100°C durante 7 minutos (os 50µl eram pipetados directamente da amostra, no caso das amostras individuais, ou de uma pool de 200µl, quando se pretendeu analisar as *pools*).
- Depois de um rápido arrefecimento, os 50µl eram congelados a -80°C até ao dia seguinte.

- Amplificação: a amplificação e posterior detecção do ADN do CMV foram efectuadas utilizando a técnica de *nested*-PCR descrita no capítulo “Estudo da prevalência da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano em Portugal”.

Como medidas de controlo, duas concentrações diferentes da estirpe AD-169, como controlo positivo, e quatro controlos negativos contendo água destilada, foram processados em cada sessão de PCR. Todas as *pools* foram testadas em paralelo com um controlo interno (1µl de AD-169 mais 4µl da *pool* de urina), para verificar a presença de inibidores da reacção de PCR. Além disso, todas as *pools* foram testadas em duplicado, em sessões diferentes.

### 3) Técnica da PCR em tempo real:

- Extracção: para extrair o DNA das amostras clínicas e da estirpe padrão (AD169) foi utilizado o kit “Jetquick Blood and Cell Culture DNA Spin Kit” (Genomed GmbH) e o procedimento foi de acordo com as instruções da bula comercial, segundo o protocolo “Whole blood, serum, plasma or other body fluids”.

- Amplificação e detecção: a técnica de PCR em tempo real foi efectuada no sistema de detecção ABI Prism 7000 (Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas).



Figura 5: ABI Prism 7000, com análise informatizada das leituras obtidas e as placas utilizadas nas reacções de amplificação e detecção.

Para os ensaios de quantificação de ADN foram utilizados “primers” e sondas específicos para a região UL83 (283 pares de bases), que codifica para a fosfoproteína pp65 do genoma do CMV (Sobral, 2005).

-“Primers” utilizados na PCR em tempo Real: 5’- CCCTCCGGCAAGCTCTTT- 3’;  
5’- CAGGTCCTCTTCCACGTCAGA – 3’.

- Sonda utilizada: 5’- TGCACGTCACGCTGG – 3’.

- Extremidade 5’: *Repórter* utilizado – FAM.
- Extremidade 3’: *Quencher* utilizado – MGB. (Esta sonda, classificada como sonda de hidrólise, tem um *Quencher* não fluorescente na extremidade 3’ e é denominada de MGB (*minor groove binding*), uma vez que se liga, na porção terminal 3’, ao sulco menor do ADN (*minor groove* da cadeia dupla de DNA).

A sensibilidade analítica desta técnica foi anteriormente testada no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas e foi descrita como sendo de 200 cópias/mL, ou seja, detectou consistentemente, em repetidos ensaios, diluições sucessivas de uma suspensão da estirpe AD-169 até à concentração referida (Melo e Silva, 2008).

Como padrões para a quantificação, foram utilizadas diluições de uma suspensão com concentração conhecida de AD-169 (a quantificação desta suspensão de AD-169 foi efectuada no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Curry Cabral, pela Dra Madalena Almeida Santos, tendo sido utilizado o kit comercial “*artus* CMV LC PCR kit” e como aparelho de amplificação e quantificação o Rotor-Gene 3000, Corbett

Research). A concentração mais elevada utilizada para a curva de calibração foi de 357 000 000 cópias/mL e a menor de 357 cópias/mL. As quantificações das amostras individuais e das *pools* foram obtidas por extrapolação dos CT (*threshold cycle* ou ciclo limiar: ciclo onde a linha de base da fluorescência ultrapassa em 10 vezes o desvio padrão da mesma, relativamente aos ciclos iniciais) na curva de calibração com os padrões referidos no parágrafo anterior. Os resultados quantitativos foram expressos em “cópias/mL”.

Para verificar a existência de inibidores nas amostras de urina, foi utilizada uma suspensão de AD-169 como controlo interno na PCR em tempo real. Para isso, 1µL da suspensão da AD-169 foi adicionada a 4 µL de água destilada e a concentração desta suspensão foi determinada. No mesmo ensaio, 1µL da suspensão da AD-169 foi igualmente adicionado a 4µL de cada uma das amostras positivas que foram, seguidamente, testadas individualmente.

Foi também utilizado um teste semelhante para detectar a presença de inibidores em *pools* negativas, misturando igualmente 1µL de uma suspensão da AD-169 a 4µL do extraído da *pool*.

Nos ensaios realizados em PCR em tempo real as concentrações utilizadas em cada reacção foram as seguintes:

- 1X TaqMan Universal PCR Master Mix
- 7 µMolar de primers de CMV
- 0,3 µMolar de sonda
- O volume final na mistura de PCR em tempo real em cada uma das reacções foi de 21µL, à qual foram adicionados 4µL de cada amostra (após extracção), perfazendo 25µL de volume final.

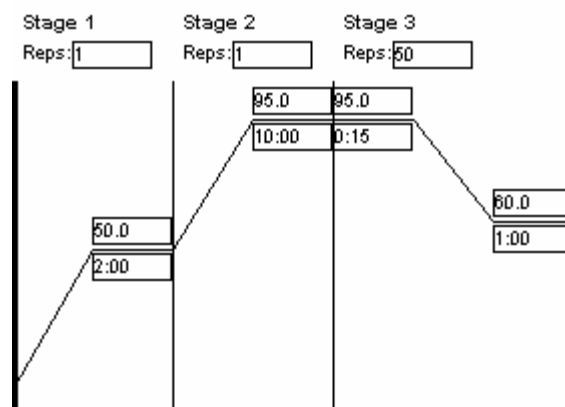


Figura 6:Ciclo de amplificação da PCR em tempo real

O primeiro passo no ciclo térmico, 50°C durante dois minutos, é utilizado para a activação da enzima Uracil-N-glycosylase. Os seguintes passos da PCR foram:

- Desnaturação inicial a 95° durante 10 minutos
- 50 ciclos:
  - Desnaturação a 95° durante 15 segundos
  - Hibridação/Extensão a 60° durante 1 minuto

### 3.3.3 Resultados

1) Fase 1: dezassete das 74 amostras de urina foram positivas pelos dois métodos, sendo as restantes 57 negativas (tabela 12).

Tabela 12: Resultados comparativos das culturas celulares com a nested-PCR em amostras testadas isoladamente (fase 1).

|                                 | Nested PCR positiva | Nested PCR negativa |
|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Cultura celular positiva</b> | 17                  | 0                   |
| <b>Cultura celular negativa</b> | 0                   | 57                  |

A informação clínica destas 17 amostras positivas foi a seguinte:

- Infecções congénitas sintomáticas: três
- Infecções congénitas assintomáticas: seis
- Infecções perinatais: oito

As amostras negativas foram colhidas durante as três primeiras semanas de vida (amostras negativas colhidas após as três primeiras semanas de vida não foram testadas pelo método das *pools* na fase 1).

As 57 amostras negativas foram divididas em três *pools*, contendo cada uma 19 amostras. As três *pools* foram negativas, quando testadas isoladamente, mas todos os 51 cruzamentos (cada cruzamento resultante de uma *pool* negativa com uma amostra positiva) foram positivos pela técnica de *nested*-PCR.

2) Fase 2: quinze das 180 amostras testadas individualmente por cultura celular foram positivas e as restantes 165 negativas (tabela 13).

Tabela 13: Resultados comparativos entre as culturas celulares nas amostras individuais e a detecção pelo método das *pools* (fase 2).

|   | <b>Nested PCR positiva pelo<br/>método das <i>pools</i></b> | <b>Nested PCR negativa pelo<br/>método das <i>pools</i></b> |
|---|---|---|
| <b>Cultura celular positiva na<br/>amostra individual</b> | 15  | 0   |
| <b>Cultura celular negativa<br/>na amostra individual</b> | 0   | 165   |

A informação clínica destas 15 amostras foi a seguinte:

- Infecção congénita sintomática: cinco
- Infecção congénita assintomática: nove
- Infecção peri-natal: uma

Das 165 amostras negativas testadas, 160 foram colhidas durante as três primeiras semanas de vida.

Seguindo o algoritmo descrito na figura 4, o método das *pools*, com a técnica de *nested*-PCR, identificou correctamente as 15 amostras de urina positivas: sete das nove *pools* de 20 amostras cada, foram positivas; cada uma destas *pools* positivas foi subdividida em *pools* de cinco amostras cada (totalizando 28 *pools* de 5 amostras), 11 das quais foram positivas; quando testadas individualmente, quatro e sete destas *pools* tinham, respectivamente, duas e uma amostras positivas.

3) Fase 3: os resultados da fase 3 estão expressos na tabela 3. Da esquerda para a direita, as primeiras duas colunas referem-se às *pools* iniciais de 20 amostras e respectivos resultados quantitativos com a PCR em tempo real. As colunas seguintes reportam, respectivamente, os resultados das *pools* de cinco amostras (terceira e quarta colunas) e as duas seguintes os resultados das urinas estudadas individualmente (só se efectuou a determinação individual quando a *pool* de cinco amostras foi positiva). Todos os resultados estão expressos em “cópias/mL”. A última coluna descreve o tipo de infecção e a altura da realização do diagnóstico.

A utilização da PCR em tempo real nas *pools* de urina permitiu, à semelhança da fase 2, a detecção de todas as urinas positivas, sem resultados falsamente positivos nas sete *pools* constituídas exclusivamente por urinas negativas. Nos resultados positivos das *pools* iniciais de 20 amostras, seguiram-se as confirmações nas *pools* de cinco e, nas positivas, a confirmação individual de qual ou quais as urinas positivas.

Quando os resultados foram positivos mas a elevação significativa da linha de base observava-se depois do último padrão da curva de calibração, os mesmos são referidos como “<357 cópias/mL”. Quando não havia elevação significativa da linha de base, os resultados foram considerados como negativos.

As amostras provenientes de infecção congénita, colhidas nas primeiras três semanas de vida, apresentaram cargas víricas que variaram entre 6422 e 40739232 cópias/mL.

Tabela 14: Resultados da fase 3.

| <i>Pool</i> 20 | Resultados | <i>Pool</i> 5 | Resultados | Urinhas individuais | Resultados | Tipo de infecção |
|----------------|------------|---------------|------------|---------------------|------------|------------------|
| 1              | Negativo   |               |            |                     |            |                  |
| 2              | 805602     | 2.1,2.2,2.3   | negativo   |                     |            |                  |
|                |            |               |            |                     |            |                  |
|                |            | 2.4           | 2528158    | 2.4.1               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 2.4.2               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 2.4.3               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 2.4.4               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 2.4.5               | 40739232   | C; A; <3         |
| 3              | 3019       | 3.1           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 3.2           | 11455      | 3.2.1               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 3.2.2               | 42000      | C; A; >3         |
|                |            |               |            | 3.2.3               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 3.2.4               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 3.2.5               | negativo   |                  |
|                |            | 3.3           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 3.4           | < 357      | 3.4.1               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 3.4.2               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 3.4.3               | < 357      | P; S; >3         |
|                |            |               |            | 3.4.4               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 3.4.5               | < 357      | C; A; >3         |
| 5              | 425709     | 5.1           | 608449     | 5.1.1               | 149240     | C; S; <3         |
|                |            |               |            | 5.1.2               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 5.1.3               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 5.1.4               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 5.1.5               | negativo   |                  |
|                |            | 5.2           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 5.3           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 5.4           | 928030     | 5.4.1               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 5.4.2               | 6422       | C; A; <3         |
|                |            |               |            | 5.4.3               | 10808973   | C; S; >3         |
|                |            |               |            | 5.4.4               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 5.4.5               | negativo   |                  |
| 6              | 329361     | 6.1           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 6.2           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 6.3           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 6.4           | 359942     | 6.4.1               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 6.4.2               | negativo*  |                  |
|                |            |               |            | 6.4.3               | 5370116    | C; A; <3         |
|                |            |               |            | 6.4.4               | negativo*  |                  |
|                |            |               |            | 6.4.5               | negativo   |                  |
| 7              | negativo   |               |            |                     |            |                  |
| 8              | 90633      | 8.1           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 8.2           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 8.3           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 8.4           | 130157     | 8.4.1               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 8.4.2               | negativo*  |                  |
|                |            |               |            | 8.4.3               | 1824759    | C; S; <3         |
|                |            |               |            | 8.4.4               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 8.4.5               | negativo   |                  |
| 9              | 9001       | 9.1           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 9.2           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 9.3           | negativo   |                     |            |                  |
|                |            | 9.4           | 31144      | 9.4.1               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 9.4.2               | negativo*  |                  |
|                |            |               |            | 9.4.3               | negativo   |                  |
|                |            |               |            | 9.4.4               | 109666     | C; S; <3         |
|                |            |               |            | 9.4.5               | negativo   |                  |

C- infecção congénita; P- infecção perinatal; S- infecção sintomática; A- infecção assintomática; <3- diagnóstico realizado nas três primeiras semanas de vida; >3- diagnóstico realizado após as três primeiras semanas de vida.



Na tabela 15 podem observar-se os resultados dos ensaios utilizados para testar a existência de inibidores da PCR nas amostras positivas de urina. Da esquerda para a direita, podem ver-se na primeira coluna os resultados quantitativos das amostras obtidos neste ensaio; a segunda coluna apresenta os resultados da suspensão de AD-169 utilizada como controlo interno para cada amostra; na terceira e quarta colunas podem observar-se, respectivamente, os resultados que se esperariam após a adição de 2µl do controlo interno a 8µl da amostra individual e os resultados obtidos. Todos os resultados estão expressos em “cópias/mL”.

Tabela 15: Resultados do teste para pesquisa de inibidores nas amostras individuais.

| <b>Amostras positivas</b> | <b>Quantificação das amostras</b> | <b>Quantificação do controlo interno</b> | <b>Resultado esperado</b> | <b>Resultado obtido</b> |
|---------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------|-------------------------|
| Amostra 2.4.5             | 135452379                         | 77829                                    | 108377469                 | 116435269               |
| Amostra 3.2.2             | 44524                             | 26441                                    | 40907                     | 38900                   |
| Amostra 3.4.3             | 393                               | 17400                                    | 3794                      | 8372                    |
| Amostra 3.4.5             | 472                               | 17400                                    | 3858                      | 7059                    |
| Amostra 5.1.1             | 301176                            | 17400                                    | 244421                    | 141325                  |
| Amostra 5.4.2             | 15134                             | 17400                                    | 15587                     | 11007                   |
| Amostra 5.4.3             | 33693238                          | 77829                                    | 26970156                  | 51042724                |
| Amostra 6.4.3             | 2286110                           | 17400                                    | 1832368                   | 2601196                 |
| Amostra 8.4.3             | 1734674                           | 17400                                    | 1391219                   | 1532769                 |
| Amostra 9.4.4             | 313631                            | 31241                                    | 254029                    | 283394                  |

Na tabela 16 estão representados os resultados obtidos com o ensaio utilizado para testar a existência de inibidores da PCR nas *pools* negativas. Da esquerda para a direita: na primeira coluna podem ver-se os resultados quantitativos da suspensão de AD-169 utilizada como controlo interno para cada *pool*; na segunda e terceira podem observar-se, respectivamente, os resultados que se esperariam após a adição de 2µl do controlo interno a 8µl de cada *pool* e os resultados obtidos. Todos os resultados estão expressos em “cópias/mL”.

Tabela 16: Resultados do teste para pesquisa de inibidores nas *pools* negativas.

| <b><i>Pools</i> negativas</b> | <b>Quantificação do controlo interno</b> | <b>Resultado esperado</b> | <b>Resultado obtido</b> |
|-------------------------------|--|---------------------------|-------------------------|
| <i>Pool 1</i>                 | 40508                                    | 8101                      | 6859                    |
| <i>Pool 7</i>                 | 40508                                    | 8101                      | 9112                    |
| <i>Pool 10</i>                | 26441                                    | 5288                      | 7807                    |
| <i>Pool 11</i>                | 26441                                    | 5288                      | 6311                    |
| <i>Pool 12</i>                | 26441                                    | 5288                      | 9436                    |
| <i>Pool 13</i>                | 26441                                    | 5288                      | 7237                    |
| <i>Pool 14</i>                | 26441                                    | 5288                      | 4693                    |

### 3.3.4 Discussão

Neste trabalho foi descrita a possibilidade de utilizar *pools* de urinas para detectar a infecção congénita por CMV. Que seja do nosso conhecimento, esta possibilidade nunca foi abordada por outras equipas.

O método das *pools* apresentado neste trabalho teve correlação total com o método de referência (pesquisa do vírus, por cultura celular, na urina de um recém-nascido até às três semanas de vida). Esta correlação verificou-se quer na fase 1, com *pools* artificialmente preparadas com amostras conhecidas positivas e negativas (*pools* com 19 amostras negativas e uma positiva), quer nas fases 2 e 3, com *pools* geradas com as amostras que chegavam ao laboratório para pesquisa de virúria. Na primeira fase, este método detectou correctamente os 51 cruzamentos (três *pools* com 19 amostras negativas cada, que foram testadas com cada uma das 17 amostras positivas). Na segunda e terceira fases, utilizando o algoritmo descrito, as urinas positivas por cultura celular, de crianças com infecção congénita, foram todas correctamente detectadas. Assim, estes resultados sugerem que as *pools* de urinas podem ser utilizadas para detectar a infecção congénita por CMV, com sensibilidade e especificidade idênticas às do método de referência, não tendo sido detectados resultados falsamente positivos ou negativos.

Neste estudo foram incluídos casos de infecção sintomática e assintomática. Trata-se de um ponto importante, uma vez que a carga vírica na urina, em casos de infecção assintomática, é geralmente mais baixa (Boppana e col., 2005). Dado que a utilização deste método se destina à realização de rastreios em recém-nascidos, ele deveria detectar com idêntica sensibilidade as infecções sintomáticas e as assintomáticas, o que se verificou neste estudo. De referir que uma das amostras de infecção congénita assintomática cujo resultado quantitativo na fase 3 foi baixo (positivo mas inferior a 357 cópias/mL) e que provavelmente não seria detectada pelo método das *pools*, se na mesma *pool* não existissem mais amostras positivas (tabela 14 -*pool* 3), foi colhida após os seis meses de vida, mas era proveniente de uma criança cuja carga vírica na colheita das primeiras três semanas de vida foi de 40739232 cópias/mL. Assim, esta metodologia detectou todos os casos de infecção congénita, quando a colheita se efectuou no período correcto para o efeito, as três primeiras semanas de vida da criança, resultados estes previsíveis, dadas as elevadas cargas víricas observadas em todas as amostras colhidas neste período (entre 6422 e 40739232 cópias/mL).

Apesar deste estudo estar centrado no diagnóstico da infecção congénita e esta implicar uma colheita durante as três primeiras semanas de vida, algumas amostras colhidas após as três semanas de vida, correspondendo a casos de infecção peri-natal, foram igualmente testadas e detectadas. No entanto, uma destas amostras, testada nas fases 2 e 3, teria uma carga muito baixa (inferior a 375 cópias/mL), que poderia não ser detectada após a necessária diluição de 1/20 para fazer-se uma *pool*. Ela foi provavelmente detectada porque na *pool* onde estava inserida havia mais urinas positivas, o que fez positivar essa *pool* e obrigar ao estudo individual das amostras. Todavia, deve ser reforçado que o método descrito neste estudo teve como objectivo encontrar uma metodologia que permita o rastreio da infecção congénita, situação onde será certamente mais rentável, devido quer ao maior número de amostras envolvidas quer, sobretudo, ao esperado menor número de casos positivos nesta situação. Se a metodologia aqui descrita fosse utilizada para o diagnóstico de rotina, ou seja, quando existe suspeita clínica ou laboratorial de infecção congénita ou peri-natal, seria muito provável que em cada *pool* de 20 amostras houvesse pelo menos uma amostra positiva, pelo que a vantagem de utilização desta estratégia diagnostica se perderia, uma vez que ela só será rentável se a maioria das *pools* for negativa. Foi, de resto, o que aconteceu na

fase 2, quando se aplicou o método das *pools* ao diagnóstico de rotina no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Cova da Beira, onde apenas duas das nove *pools* testadas foram negativas. Ao contrário, num rastreio e para uma estimada prevalência de cerca de 1% de infecção congénita, haverá uma *pool* positiva em cada cinco testadas, pelo que, de acordo com o algoritmo sugerido neste trabalho, haverá uma redução significativa do número de reacções de PCR a serem realizadas, por comparação com os testes individuais (cerca de 90% de redução).

Como já foi referido no capítulo 2, o CMV é um dos dois principais causadores de surdez sensorineural nas crianças (Morton e col., 2006), com uma percentagem de casos na ordem dos 20 a 30%, ultrapassando mesmo os 40% nos casos de surdez mais profunda (Barbi e col., 2003), e constitui a complicação tardia mais importante na criança que nasceu com infecção congénita por CMV (Stagno e col., 1977; Grosse e col., 2008). A surdez causada pelo CMV tem sido descrita como uni ou bilateral, profunda em cerca de 1/4 dos casos, mas de início tardio em mais de metade dos casos (Barbi e col., 2006), sendo este último dado de particular relevância no contexto do presente capítulo. De facto, este início tardio desta manifestação clínica, longe de beneficiar a criança, como se poderia retirar numa primeira análise, tem como principal consequência que o rastreio audiológico neo-natal apenas detectará a surdez causada por este agente em 30 a 50% dos casos (Fowler e col., 1997). Assim, com um rastreio sem alterações e sem qualquer informação adicional que justifique a monitorização da criança, esta desenvolverá a surdez de uma forma insidiosa e que, em muitos dos casos, só terá repercussões importantes quando finalmente suspeitada pela família ou pelos profissionais de educação. As crianças surdas que não são diagnosticadas precocemente sentem-se isoladas, têm problemas de aprendizagem e no desenvolvimento da personalidade, sendo frequentemente consideradas obstinadas ou mentalmente atrasadas (Yow, 1989). Só a detecção da infecção congénita por CMV no recém-nascido permitirá o seguimento destas crianças, que por sua vez levará ao reconhecimento precoce das sequelas, particularmente da surdez, em todas as crianças infectadas, tornando possível a intervenção desde os primeiros tempos de vida (Alford e col., 1990; Barbi e col., 2000; Kennedy e col., 2006).

A questão do rastreio neo-natal torna-se, assim, prioritária, para se conseguir uma prevenção terciária eficaz que, não evitando a infecção materna nem a sua transmissão

fetal, poderá, no entanto, minimizar significativamente os efeitos da principal consequência tardia da infecção congénita citomegálica, a surdez. A importância deste rastreio é reconhecida desde há vários anos (Yow, 1989), mas as condições para a sua realização, de uma forma que seja técnica e economicamente viável, ainda não estão reunidas (ECCI recommendations, 2006). Com efeito, embora algumas metodologias tenham sido descritas como podendo ter aplicação para um rastreio desta natureza (Binda e col., 2004; Nozawa e col., 2007), não nos parece que a redução quer nos tempos de execução, quer do ponto de vista económico, seja substancial nestes casos. A metodologia das *pools* aqui descrita, ao permitir uma redução bastante significativa, quer nos tempos de execução quer nos custos em reagentes (estimamos que a redução neste último ponto poderá atingir os 90%, relativamente à detecção individual por PCR nas amostras de urina) abre a possibilidade efectiva de utilizar esta técnica para o rastreio da infecção congénita por CMV nos recém-nascidos.

## **CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES**

A análise dos resultados descritos nesta dissertação permitem, em nossa opinião, retirar algumas ilações relativas à problemática da infecção congénita por CMV que já foram, de resto, sumariamente abordadas nas discussões destes capítulos.

No que se refere ao estudo especificamente ligado aos dados portugueses, ele permite estimar, pela primeira vez a nível nacional, o número de casos de infecção congénita por CMV. A prevalência de 1.05% encontra-se dentro do intervalo citado na literatura mas ligeiramente acima dos últimos apresentados por equipas europeias. Os prováveis motivos para este valor foram abordados no capítulo respectivo. Apesar do intervalo de confiança permitir uma variação importante nas estimativas, estes resultados demonstram em definitivo a importância que este vírus tem, não só no contexto da infecção congénita, onde certamente será o primeiro agente, como na saúde infantil em geral.

Embora o estudo não permita avaliar o número de crianças com sequelas significativas devidas à infecção, não nos parece muito provável que as taxas de complicações sejam substancialmente diferentes das encontradas na literatura. No entanto, apenas estudos alargados, como o que decorre actualmente em colaboração com a Unidade de Vigilância Pediátrica, poderão confirmar esta hipótese.

Se o trabalho anterior nos permite estimar que haverá, anualmente, cerca de 1000 novos casos de infecção congénita por CMV, a questão seguinte prende-se, como referimos no capítulo “Introdução”, com a sua detecção. Esta, para ser considerada pelos clínicos como de utilização rotineira e universal, de forma a constituir um verdadeiro rastreio, terá de se efectuar de uma forma segura mas economicamente viável. No capítulo “Diagnóstico da infecção congénita citomegálica através da detecção do ADN vírico em *pools* de amostras de urina”, foram apresentados os resultados de uma abordagem que pensamos ser uma alternativa concreta para o início de um rastreio pós-natal desta infecção, com as vantagens referidas neste capítulo.

A fase inicial do trabalho das *pools* permitiu verificar que a hipótese de utilização destas para o diagnóstico da infecção congénita citomegálica era viável, embora a técnica utilizada para esse fim, uma técnica *in house* de *nested-PCR*, seja mais exigente que as técnicas de biologia molecular habitualmente comercializadas para este ou outros

vírus. A leitura da segunda parte do trabalho sugere que poderemos aplicar esta abordagem utilizando técnicas mais recentes, com maior simplicidade de execução e menor probabilidade de contaminação, como é o caso da PCR em tempo real. Isso permitirá que mais laboratórios possam aderir a esta abordagem, uma vez que existem já comercializadas técnicas de PCR em tempo real para o CMV, o que seria fundamental para no futuro se constituir uma rede de laboratórios que possam cobrir todo o território nacional, de forma a efectuar-se um verdadeiro rastreio.

É nosso objectivo tentar contribuir para a implementação deste rastreio a nível nacional, uma vez que, assim o cremos, num futuro relativamente breve, esta abordagem será uma realidade aceite internacionalmente.

Os resultados obtidos no capítulo “Diagnóstico pré-natal da infecção citomegálica” estão em consonância com o que é descrito pelas equipas que internacionalmente revelam mais experiência nesta matéria. O diagnóstico pré-natal, tal como foi efectuado pelas equipas mencionadas nesse capítulo, parece ser uma ferramenta útil na avaliação pré-natal da infecção citomegálica, embora esta revisão e o ensaio efectuado sobre a avidéz revelem aquela que é, a nosso ver, a principal fraqueza do diagnóstico pré-natal, a selecção das grávidas para amniocentese.

Claramente são efectuadas amniocenteses em número excessivo e este facto ficou bem patente neste trabalho, com diferenças estatisticamente significativas nos resultados obtidos com os vários métodos de selecção para este exame invasivo. Tal como referido na “Discussão” deste capítulo, a avidéz constitui, conjuntamente com o método serológico de referência, a seroconversão das IgG, a melhor indicação para se avançar no passo seguinte do diagnóstico pré-natal, a realização da amniocentese. Discutível continuará a ser o limiar de exclusão da infecção recente mas, pelos argumentos anteriormente apresentados, defendemos que o limiar de 0,6 deve ser adoptado para a distinção entre as infecções “recentes” e as “tardias”, quando se utilizam os reagentes comerciais mais divulgados no nosso país, embora a confirmação pela técnica de WB nos casos de avidéz entre 0,6 e 0,8 se nos afigure uma opção alternativa, até à obtenção de mais dados sobre esta matéria.

A ecografia, apesar da sua baixa percentagem de resultados positivos, deverá acompanhar a avidéz e a seroconversão na selecção de casos para amniocentese.



Em resumo, para além da prevenção primária, objectivo máximo que evitaria a infecção materna, só a conjugação dos rastreios pré e pós-natal permitirá alguma alteração da história natural desta infecção congénita que atinge um número significativo de crianças no nosso país.

O rastreio pré-natal permitirá uma actuação mais rápida, quer farmacológica, se se confirmarem os resultados promissores já publicados, quer através da terminação da gravidez, nos casos devidamente justificados. Este rastreio não detectará todos os casos de infecção congénita, podendo a percentagem de falsos negativos ser considerável numa população com elevada seroprevalência. O rastreio pós-natal tem a capacidade de detectar todos os casos, mas apenas permitirá a detecção precoce das sequelas, embora com a possibilidade de minimizar estas.

Estas duas abordagens foram analisadas durante esta dissertação, com resultados promissores no que se refere a uma eventual utilização em programas futuros dirigidos para esta área.

## **CAPÍTULO 5 – BIBLIOGRAFIA**

Abbott KC, Hypolite IO, Viola R, Poropatich RK, Hshieh P, Cruess D, Hawkes CA, Agodoa LY. Hospitalizations for cytomegalovirus disease after renal transplantation in the United States. *Ann Epidemiol.* 2002; 12: 402–409.

Adler SP, Finney JW, Manganello AM, Best AM. Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women. *J Pediatr.* 2004; 145(4):485-491.

Adler SP, Finney JW, Manganello AM, Best AM. Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus by changing behaviors: a randomized controlled trial. *Pediatr Infect Dis J.* 1996;15(3):240-246.

Adler SP; Hur JK; Wang JB; Vetrovec GW. Prior infection with cytomegalovirus is not a major risk factor for angiographically demonstrated coronary artery atherosclerosis. *J Infect Dis.* 1998;177(1):209-212.

Alford CA, Stagno S, Pass RF, Britt WJ. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis.* 1990;12, Suppl 7:S745-753.

Allain JP. Genomic screening for blood-borne viruses in transfusion settings. *Clin Lab Haematol.* 2000; 22:1-10.

Allice T, Enrietto M, Pittaluga F, Varetto S, Franchello A, Marchiaro G, Ghisetti V. Quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time polymerase chain reaction in peripheral blood specimens of patients with solid organ transplants: comparison with end-point PCR and pp65 antigen test. *J Med Virol.* 2006;78(7):915-922.

Almeida S, Paixão P, Gouveia P, Vilarinho L. “Diagnóstico da infecção congénita pelo CMV através da detecção do DNA viral em Guthrie cards”. Comunicação oral apresentada no “I Congresso Nacional de Virologia”. Coimbra, 2005.

Almeida S, Paixão P, Gouveia P, Vilarinho L. “Diagnosis of congenital Cytomegalovirus infection in dried blood spots: a 5 year experience in Portugal”. Comunicação apresentada, sob a forma de poster, na “Conference on Congenital CMV Infection”. Orvieto, 2006.

Amorim ML, Cabeda JM, Seca R, Mendes AC, Castro AP, Amorim JM. CMV infection of liver transplant recipients: comparison of antigenemia and molecular biology assays. *BMC Infect Dis.* 2001; 1: 2.

Antón A, Cervera C, Pumarola T, Moreno A, Benito N, Linares L, Esteva C, Cofán F, Jiménez de Anta MT, Marcos MA. Human herpesvirus 7 primary infection in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2008;85(2):298-302.

Azam AZ, Vial Y, Fawer CL, Zufferey J, Hohlfeld P. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol.* 2001; 97: 443-448.

Baccard-Longere M, Freymuth F, Cointe D, Seigneurin JM, Grangeot-Keros L. Multicenter evaluation of a rapid and convenient method for determination of cytomegalovirus immunoglobulin G avidity. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001, 8(2): 429-31.

Balcarek KB, Warren W, Smith RJ, Lyon MD, Pass RF. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection by detection of virus in saliva. *J Infect Dis.* 1993;167(6):1433-1436.

Barbi M, Binda S, Primache V, Luraschi C, Corbetta C. Diagnosis of congenital Cytomegalovirus Infection by detection of viral DNA in dried spots. *Clin Diag Virol.* 1996; 6:27-32.

Barbi M, Binda S, Primache V, Caroppo S, Didò P, Guidotti P, Corbetta C, Melotti D. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *J Clin Virol.* 2000; 17:159-165.

Barbi M, Binda S, Caroppo S, Ambrosetti U, Corbetta C, Sergi P. A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss. *Pediatr Infect Dis J.* 2003; 22(1):39-42.

Barbi M, Binda S, Caroppo S, Calvario A, Germinario C, Bozzi A, Tanzi ML, Veronesi L, Mura I, Piana A, Solinas G, Pagni L, Bevilaqua G, Mosca F. Multicity Italian study of congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25(2):156-159.

Barbi M, Binda S, Caroppo S, Primache V. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *J Clin Virol.* 2006;35:206-209.

Begovac J; Soldo I; Presecki V. Cytomegalovirus mononucleosis in children compared with the infection in adults and with Epstein-Barr virus mononucleosis. *J Infect* 1988;17(2):121-125.

Binda S, Caroppo S, Didò P, Primache V, Veronesi L, Calvario A, Piana A, Barbi M. Modification of CMV DNA detection from dried blood spots for diagnosing congenital CMV infection. *J Clin Virol.* 2004;30(3):276-279.

Blackburn NK, Besselaar TG, Schoub BD, O'Connell KF. Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. *J Med Virol.* 1991;33(1):6-9.

Blum A; Giladi M; Weinberg M; Kaplan G; Pasternack H; Laniado S; Miller H High. Anti-cytomegalovirus (CMV) IgG antibody titer is associated with coronary artery disease and may predict post-coronary balloon angioplasty restenosis. *Am J Cardiol.* 1998 1;81(7):866-868.

Boeckh M, Woogerd PM, Stevens-Ayers T, Ray CG, Bowden RA. Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol.* 1994;32(3):832-834.

Boeckh M, Boivin G. Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11:533-554.

Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang ML, Myerson D, Stevens-Ayers T, Flowers ME, Cunningham T, Corey L. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood.* 2003; 101(2):407-414.

Bonnet F, Neau D, Viallard JF, Morlat P, Ragnaud JM, Dupon M, Legendre P, Imbert Y, Lifermann F, Le Bras M, Beylot J, Longy-Boursier M. Clinical and laboratory findings of cytomegalovirus infection in 115 hospitalized non-immunocompromised adults. *Ann Med Interne.* 2001; 152(4): 227-235.

Bonkowsky HL; Lee RV; Klatskin G. Acute granulomatous hepatitis. Occurrence in cytomegalovirus mononucleosis. *JAMA.* 1975;233(12):1284-1288.

Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J*. 1992;11(2):93-99.

Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics*. 1999;104:55-60.

Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med*. 2001;344(18):1366-1371.

Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, Rivera LB, Bradford RD, Lakeman FD, Britt WJ. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr*. 2005;146(6):817-823.

Borst A, Box AT, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(4):289-299.

Bowden RA, Sayers M, Flournoy N, Newton B, Banaji M, Thomas ED, Meyers JD. Cytomegalovirus immune globulin and seronegative blood products to prevent primary cytomegalovirus infection after marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1986;314(16):1006-1010.

Bowen EF, Griffiths PD, Davey CC, Emery VC, Johnson MA. Lessons from the natural history of cytomegalovirus. *AIDS*. 1996; 10 Suppl 1:S37-41.

Britt WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*. 1996;39(5-6):401-412.

Brum S, Nolasco F, Sousa J, Ferreira A, Possante M, Pinto JR, Barroso E, Santos JR. Leukopenia in kidney transplant patients with the association of valganciclovir and mycophenolate mofetil. *Transplant Proc*. 2008;40(3):752-754.

Büchen-Osmond, C. ICTVdB Management (2006). 00.031.2.01.001. Human herpesvirus 5. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Columbia University, New York, USA.

Burkhardt HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(2):87-91.

Campbell PT; Li JS; Wall TC; O'Connor CM; Van Trigt P; Kenney RT; Melhus O; Corey GR. Cytomegalovirus pericarditis: a case series and review of the literature. *Am J Med Sci*. 1995;309(4):229-234.

Cannon M, Davis K. Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Public Health*. 2005; 5:70-78.

Carman B. Molecular techniques should now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Rev Med Virol*. 2001;11(6):347-349.

Carlsson J; Miketic S; Brom J; Ross R; Bachmann H; Tebbe U. Prior cytomegalovirus, Chlamydia pneumoniae or Helicobacter pylori infection and the risk of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Int J Cardiol*. 2000;73(2):165-171.

Castagnola E, Cappelli B, Erba D, Rabagliati A, Lanino E, Dini G. Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation in children. *Hum Immunol*. 2004;65(5):416-422.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Knowledge and practices of obstetricians and gynecologists regarding cytomegalovirus infection during pregnancy--United States, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008;57(3):65-8.

Cheng VC, Yuen KY, Chan WM, Wong SS, Ma ES, Chan RM. Immunorestitution Disease Involving the Innate and Adaptive Response. *Clin Infect Dis*. 2000; 30(6):882-892.

Chou SW. Acquisition of donor strains of cytomegalovirus by renal-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1986;314(22):1418-1423.

Chou S. Cytomegalovirus infection and reinfection transmitted by heart transplantation. *J Infect Dis*. 1987; 155:1054-1056.

Chou S. Newer Methods for Diagnosis of Congenital Infection. *Rev Infect Dis*. 1990; 12, Suppl 7:727-736.

Chretien JH, McGinnis CG, Muller A. Venereal causes of cytomegalovirus mononucleosis. *JAMA*. 1977;238:1644-1645.

Clark DA, Emery VC, Griffiths PD. Cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and human herpesvirus-7 in hematological patients. *Semin Hematol*. 2003;40(2):154-162.

Cohen JI; Corey GR. Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore)* 1985;64(2):100-114.

Collier AC, Handsfield HH, Roberts PL, DeRouen T, Meyers JD, Leach L, Murphy VL, Verdon M, Corey L. Cytomegalovirus infection in women attending a sexually transmitted disease clinic. *J Infect Dis*. 1990;162(1):46-51.

Dahle AJ, McCollister FP, Hamner BA, Reynolds DW, Stagno S. Subclinical congenital cytomegalovirus infection and hearing impairment. *J Speech Hear Disord*. 1974;39(3):320-329.

Dar L, Pati SK, Patro AR, Deorari AK, Rai S, Kant S, Broor S, Fowler KB, Britt WJ, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection in a highly seropositive semi-urban population in India. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(9):841-3.

Deayton JR, Wilson P, Sabin CA, Davey CC, Johnson MA, Emery VC, Griffiths PD. Changes in the natural history of cytomegalovirus retinitis following the introduction of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2000;14(9):1163-1170.

Deback C, Fillet AM, Dhedin N, Barrou B, Varnous S, Najjioullah F, Bricaire F, Agut H. Monitoring of human cytomegalovirus infection in immunosuppressed patients using real-time PCR on whole blood. *J Clin Virol*. 2007;40(3):173-179.

Debiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(4):903-925.

Demmler G. Summary of a Workshop on Surveillance for Congenital Cytomegalovirus Disease. *Rev Infect Dis*. 1991;13:315-329.

Diosi P, Moldovan E, Tomescu N. Latent cytomegalovirus infection in blood donors. *Br Med J*. 1969; 4:660-662.

Dollard S, Grosse S, Ross D. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol.* 2007;17(5):355-363.

Drew WL. Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Rev Infect Dis.* 1988;10, Suppl 3:468-475.

Drew WL. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1992;14(2):608-615.

Drew WL. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20(4):408-411.

Duff P. Immunotherapy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 2005;29;353(13):1402-1404.

Dworsky M, Yow M, Stagno S, Pass RF, Alford C. Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics.* 1983;72(3):295-299.  
ECCI. ECCI recommendations. [www.ecci.ac.uk](http://www.ecci.ac.uk). 2006.

Eddleston M, Peacock S, Juniper M, Warrell DA. Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis.* 1997;24(1):52-56.

Emanuel D, Peppard J, Stover D, Gold J, Armstrong D, Hammerling U. Rapid immunodiagnosis of cytomegalovirus pneumonia by bronchoalveolar lavage using human and murine monoclonal antibodies. *Ann Intern Med.* 1986;104(4):476-481.

Fiegl M, Gerbitz A, Gaeta A, Campe H, Jaeger G, Kolb HJ. Recovery from CMV esophagitis after allogeneic bone marrow transplantation using non-myeloablative conditioning: the role of immunosuppression. *J Clin Virol.* 2005; 34(3):219-223.

Foulon I, Naessens A, Foulon W, Casteels A, Gordts F. A 10-year prospective study of sensorineural hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 2008;153(1):84-88.

Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med.* 1992;326(10):663-667.

Fowler KB, McCollister FP, Dahle AJ, Boppana S, Britt WJ, Pass RF. Progressive and fluctuating hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 1997;130:624-630.

Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *JAMA.* 2003;289(8):1008-1011.

Fowler KB, Pass RF. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. *Pediatrics.* 2006;118(2):286-292.

Fux CA, Pfister S, Nohl F, Zimmerli S. Cytomegalovirus-associated acute transverse myelitis in immunocompetent adults. *Clin Microbiol Infect.* 2003. 9(12):1187-1190.

Galarraga MC, Gomez E, de Ona M, Rodriguez A, Laures A, Boga JA, Melon S. Influence of ganciclovir prophylaxis on cytomegalovirus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7 viremia in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2005;37(5):2124-2126.

Galiatsatos P, Shrier I, Lamoureux E, Szilagyi A. Meta-analysis of outcome of cytomegalovirus colitis in immunocompetent hosts. *Dig Dis Sci.* 2005; 50(4):609-616.

Gallant JE, Moore RD, Richman DD, Keruly J, Chaisson RE. Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. *J Infect Dis.* 1992;166(6):1223-1227.

George M J., Snyderman D R., Werner B G, Griffith J, Falagas M E., Dougherty N N, Rubin R H., The Boston Center for Liver Transplantation CMVIG-Study Group. The independent role of CMV as a risk factor for invasive fungal disease in orthotopic liver transplant recipients, *Am J Med.* 1997; 103: 106–113.

Gerna G, Zipeto D, Parea M, Revello MG, Silini E, Percivalle E, Zavattoni M, Grossi P, Milanesi G. Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia. *J Infect Dis.* 1991;164(3):488-498.

Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Morini F. Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol.* 1992;30(5):1232-1237.

Gerna G, Percivalle E, Baldanti F, Sozzani S, Lanzarini P, Genini E, Lilleri D, Revello MG. Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after transfer from infected endothelial cells via transient microfusion events. *J Virol.* 2000;74(12):5629-5638.

Gerna G, Baldanti F, Lilleri D, Parea M, Torsellini M, Castiglioni B, Vitulo P, Pellegrini C, Vigano M, Grossi P, Revello MG. Human cytomegalovirus pp67 mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding preemptive therapy in heart and lung transplant recipients: a prospective, randomized, controlled, open-label trial. *Transplantation.* 2003;75(7):1012-1019.

Gerna G, Lilleri D, Baldanti F, Torsellini M, Giorgiani G, Zecca M, De Stefano P, Middeldorp J, Locatelli F, Revello MG. Human cytomegalovirus immediate-early mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding pre-emptive therapy in children and young adults undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective, randomized, open-label trial. *Blood.* 2003;101(12):5053-5060.

Gerna G, Sarasini A, Lilleri D, Percivalle E, Torsellini M, Baldanti F, Revello MG. In vitro model for the study of the dissociation of increasing antigenemia and decreasing DNAemia and viremia during treatment of human cytomegalovirus infection with ganciclovir in transplant recipients. *J Infect Dis.* 2003;188(11):1639-1647.

Gibson W. Structure and assembly of the virion. *Intervirology.* 1996;39(5-6):389-400.

Gindes L, Teperberg-Oikawa M, Sherman D, Pardo J, Rahav G. Congenital Cytomegalovirus infection following primary maternal infection in the third trimester. *BJOG.* 2008;115(7):830-835.

Giobbia M; Carniato A; Scotton PG; Marchiori GC; Vaglia A. Cytomegalovirus-associated transverse myelitis in a non-immunocompromised patient. *Infection.* 1999;27(3):228-230.



Giral M, Nguyen JM, Daguin P, Hourmant M, Cantarovich D, Dantal J, Blanche G, Josien R, Ancelet D, Souillou JP. Mycophenolate mofetil does not modify the incidence of cytomegalovirus (CMV) disease after kidney transplantation but prevents CMV-induced chronic graft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1758–1763.

Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol.* 1984;19(6):917-919.

Gleaves C, Smith T, Shuster E, Pearson G. Comparison of Standard Tube and Shell Vial Cell Culture Techniques for the Detection of Cytomegalovirus in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*, 1985; 21:217-221.

Goodrich J, Boeckh M, Bowden R. Strategies for the Prevention of Cytomegalovirus Disease After Marrow Transplantation. *Clin Infect Dis.* 1994; 19:287-298.

Goossens VJ, Blok MJ, Christiaans MH, van Hooff JP, Sillekens P, Hockerstedt K, Lautenschlager I, Middeldorp JM, Bruggeman CA. Diagnostic value of nucleic-acid-sequence-based amplification for the detection of cytomegalovirus infection in renal and liver transplant recipients. *Intervirology.* 1999;42(5-6):373-381.

Gouarin S, Gault E, Vabret A, Cointe D, Rozenberg F, Grangeot-Keros L, Barjot P, Garbarg-Chenon A, Lebon P, Freymuth F. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol*, 2002; 40(5):1767-1772.

Gouarin S, Vabret A, Scieux C, Agbalika F, Cherot J, Mengelle C, Deback C, Petitjean J, Dina J, Freymuth F. Multicentric evaluation of a new commercial cytomegalovirus real-time PCR quantitation assay. *J Virol Methods.* 2007;146(1-2):147-154.

Grangeot-Keros L, Mayaux MJ, Lebon P, Freymuth F, Eugene G, Stricker R, Dussaix E. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *J Infect Dis.* 1997;175(4):944-946.

Grangeot-Keros L, Simon B, Audibert F, Vial M. Should we routinely screen for cytomegalovirus antibody during pregnancy? *Intervirology.* 1998;41(4-5):158-162.

Grangeot-Keros L, Cointe D. Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection. *J Clin Virol.* 2001;21(3):213-221.

Gredmark S, Jonasson L, Van Gosliga D, Ernerudh J, Söderberg-Nauclér C. Active cytomegalovirus replication in patients with coronary disease. *Scand Cardiovasc J.* 2007;41(4):230-234.

Green M, Michaels MG, Katz BZ, Burroughs M, Gerber D, Shneider BL, Newell K, Rowe D, Reyes J. CMV-IVIG for prevention of Epstein Barr virus disease and posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplant recipients. *Am J Transplant.* 2006;6(8):1906-1912.

Griffiths PD, Baboonian C. A prospective study of primary cytomegalovirus infection during pregnancy: final report. *Br J Obstet Gynaecol.* 1984;91(4):307-315.

Griffiths P, Clark D, Emery V. Betaherpesviruses in transplant recipients. *J. Antimicrob Chemother.* 2000;45 Suppl T3:29-34.

- Griffiths P. Cytomegalovirus infection of the central nervous system. *Herpes*. 2004;11 Suppl 2:95A-104A.
- Griffiths PD, Walter S. Cytomegalovirus. *Curr Opin Infect Dis*. 2005; 18(3):241-245.
- Griffiths PD. CMV as a cofactor enhancing progression of AIDS. *J Clin Virol*, 2006; 35(4):489-492.
- Grosse SD, Ross DS, Dollard SC. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: A quantitative assessment. *J Clin Virol*. 2008;41(2):57-62.
- Grundy JE, Lui SF, Super M, Berry NJ, Sweny P, Fernando ON, Moorhead J, Griffiths PD. Symptomatic cytomegalovirus infection in seropositive kidney recipients: reinfection with donor virus rather than reactivation of recipient virus. *Lancet*. 1988;2(8603):132-135.
- Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L, Nicolosi A, Landini MP. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(2):476-482.
- Hahn G, Revello MG, Patrone M, Percivalle E, Campanini G, Sarasini A, Wagner M, Gallina A, Milanese G, Koszinowski U, Baldanti F, Gerna G. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J Virol*. 2004;78(18):10023-10033.
- Halwachs-Baumann G. Recent developments in human cytomegalovirus diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(3):427-439.
- Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, Dietz K, Speer CP, Jahn G. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet*. 2001;357(9255):513-518.
- Hamprecht K, Maschmann J, Muller D, Dietz K, Besenthal I, Goelz R, Middeldorp JM, Speer CP, Jahn G. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr Res*. 2004;56(4):529-535.
- Hamprecht K, Maschmann J, Jahn G, Poets CF, Goelz R. Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation. *J Clin Virol*. 2008;41(3):198-205.
- Kanj SS, Sharara AI, Clavien PA, Hamilton JD. Cytomegalovirus infection following liver transplantation: review of the literature. *Clin Infect Dis*, 1996; 22:537-549.
- Harma M, Loginov R, Piiparinen H, Halme L, Hockerstedt K, Lautenschlager I. HHV-6-DNAemia related to CMV-DNAemia after liver transplantation. *Transplant Proc*. 2005;37(2):1230-1232.
- Härmä M, Höckerstedt K, Lyytikäinen O, Lautenschlager I. HHV-6 and HHV-7 antigenemia related to CMV infection after liver transplantation. *J Med Virol*. 2006;78(6):800-805.
- Hernando S, Folgueira L, Lumbreras C, San Juan R, Maldonado S, Prieto C, Babiano MJ, Delgado J, Andres A, Moreno E, Aguado JM, Otero JR. Comparison of cytomegalovirus viral load measure by real-time PCR with pp65 antigenemia for the diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. *Transplant Proc*. 2005;37(9):4094-4096.

Hill RB Jr, Dahrling BE 2nd, Starzl TE, Rifkind D. Death after transplantation; an analysis of sixty cases. *Am J Med.* 1967;42(3):327-334.

Ho, M. Advances in understanding cytomegalovirus infection after transplantation. *Transplant Proc.* 1994;26(5 Suppl 1):7-11.

Ho M, Suwansirikul S, Dowling JN, Youngblood LA, Armstrong JA. The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *New Engl J Med.* 1975; 293:1109–1112.

Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol.* 2008;197(2):65-73.

JK. Cytomegalovirus infection in sex partners: evidence for sexual transmission. *J Infect Dis.* 1985;151(2):344-348.

Heininger A, Jahn G, Engel C, Notheisen T, Unertl K, Hamprecht K. Human cytomegalovirus infections in nonimmunosuppressed critically ill patients. *Crit Care Med.* 2001;29(3):681-682.

High KP. Atherosclerosis and infection due to *Chlamydia pneumoniae* or cytomegalovirus: weighing the evidence. *Clin Infect Dis.* 1999;28(4):746-749.

Hyams KC, Krogwold RA, Brock S, Wignall FS, Cross E, Hayes C. Heterosexual transmission of viral hepatitis and cytomegalovirus infection among United States military personnel stationed in the western Pacific. *Sex Transm Dis.* 1993;20(1):36-40.

Istas AS, Demmler GJ, Dobbins JG, Stewart JA. Surveillance for congenital cytomegalovirus disease: a report from the National Congenital Cytomegalovirus Disease Registry. *Clin Infect Dis.* 1995;20:665-670.

Jabs DA, Holbrook JT, Van Natta ML, Clark R, Jacobson MA, Kempen JH, Murphy RL; Studies of Ocular Complications of AIDS Research Group. Risk factors for mortality in patients with AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy. *Ophthalmology.* 2005;112(5):771-779.

Jacobs BC; Rothbarth PH; van der Meche FG; Herbrink P; Schmitz PI; de Klerk MA; van Doorn PA. The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barre syndrome: a case-control study. *Neurology* 1998;51(4):1110-1115.

Jacquemard F, Yamamoto M, Costa JM, Romand S, Jaqz-Aigrain E, Dejean A, Daffos F, Ville Y. Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG.* 2007;114(9):1113-1121.

Johansson PJ, Jonsson M, Ahlfors K, Ivarsson SA, Svanberg L, Guthenberg C. Retrospective diagnostics of congenital cytomegalovirus infection performed by polymerase chain reaction in blood stored on filter paper. *Scand J Infect Dis.* 1997;29(5):465-468.

Just-Nübling G, Korn S, Ludwig B, Stephan C, Doerr H.W., Preiser W. Primary Cytomegalovirus Infection in an Outpatient Setting—Laboratory Markers and Clinical Aspects. *Infection.* 2003;31(5):307.

Karavellas MP, Plummer DJ, Macdonald JC, Torriani FJ, Shufelt CL, Azen SP, Freeman WR. Incidence of immune recovery vitritis in cytomegalovirus retinitis patients following institution of successful highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 1999;179(3):697-700.

Kaufman HS; Kahn AC; Iacobuzio-Donahue C; Talamini MA; Lillemoe KD; Hamilton SR. Cytomegaloviral enterocolitis: clinical associations and outcome. *Dis Colon Rectum*. 1999;42(1):24-30.

Kearns AM, Guiver M, James V, King J. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR for the detection of human cytomegalovirus. *J Virol Methods*. 2001;95(1-2):121-131.

Kennedy C, McCann D, Campbell M, Law C, Mullee M, Petrou S, Watkin P, Worsfold S, Yuen Ho, Stevenson J. Language ability after early detection of permanent childhood hearing impairment. *N Engl J Med*. 2006; 354:2131-2141.

Kenneson A, Cannon M. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Microbiol*. 2007;17:253-276.

Kerrey BT, Morrow A, Geraghty S, Huey N, Sapsford A, Schleiss MR. Breast milk as a source for acquisition of cytomegalovirus (HCMV) in a premature infant with sepsis syndrome: detection by real-time PCR. *J Clin Virol*. 2006;35(3):313-316.

Kidd IM, Clark DA, Sabin CA, Andrew D, Hassan-Walker AF, Sweny P, Griffiths PD, Emery VC. Prospective study of human betaherpesviruses after renal transplantation: association of human herpesvirus 7 and cytomegalovirus co-infection with cytomegalovirus disease and increased rejection. *Transplantation*. 2000 ;69(11):2400-2404.

Kimberlin DW, Lin CY, Sanchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, Jacobs RF, Vaudry W, Pass RF, Kiell JM, Soong SJ, Whitley RJ; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr*. 2003;143(1):16-25.

Klauber E, Briski LE, Khatib R. Cytomegalovirus colitis in the immunocompetent host: an overview. *Scand J Infect Dis*. 1998;30(6):559-64.

Klemola E, Kaariainen L. Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. *Br Med J*. 1965; 2:1099–1102.

Kyto V; Vuorinen T; Saukko P; Lautenschlager I; Lignitz E; Saraste A; Voipio-Pulkki LM. Cytomegalovirus infection of the heart is common in patients with fatal myocarditis. *Clin Infect Dis*. 2005;40(5):683-688.

Kuhl U; Pauschinger M; Noutsias M; Seeberg B; Bock T; Lassner D; Poller W; Kandolf R; Schultheiss HP. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2005;111(7):887-893.

Kutza AST, Muhl E, Hackstein H, Kirchner H, Bein G. High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients. *Clin Infect Dis*. 1998;26:1076–1082.

Laing RB; Dykhuizen RS; Smith CC; Molyneaux PJ. Parenteral ganciclovir treatment of acute CMV infection in the immunocompetent host. *Infection*. 1997;25(1):44-46.

Lamb SB, Stern H. Cytomegalovirus mononucleosis with jaundice as presenting sign. *Lancet*. 1966; 2:1003–1007.

Lautenschlager I, Linnavuori K, Höckerstedt K. Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation*. 2000;69(12):2561-2566.

Lazzarotto T, Dalla Casa B, Campisi B, Landini MP "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of Cytomegalovirus-IgM: Comparison Between Eight Commercial Kits, Immunofluorescence, and Immunoblotting" *J Clin Lab Anal*, 1992, 6:216-218.

Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, Abate DA, Varani S, Landini MP. Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997;4(4):469-473.

Lazzarotto T, Guerra B, Spezzacatena P, Varani S, Gabrielli L, Pradelli P, Rumpianesi F, Banzi C, Bovicelli L, Landini M. Prenatal Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection, *J Clin Microbiol*. 1998; 36:3540-3544.

Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, Abate DA, Gabrielli L, Varani S, Landini MP. Cytomegalovirus infection in pregnancy: a still complicated diagnostic problem. *Intervirology*. 1998;41(4-5):149-157.

Lazzarotto T, Varani S, Gabrielli L, Spezzacatena P, Landini MP. New Advances in the Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection. *Intervirology*. 1999; 42:390-397.

Lazzarotto T, Gabrielli L, Lanari M, Guerra B, Bellucci T, Sassi M, Landini MP. Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Hum Immunol*. 2004;65(5):410-415.

Lehto JT, Lemstrom K, Halme M, Lappalainen M, Lommi J, Sipponen J, Harjula A, Tukiainen P, Koskinen PK. A prospective study comparing cytomegalovirus antigenemia, DNAemia and RNAemia tests in guiding pre-emptive therapy in thoracic organ transplant recipients. *Transpl Int*. 2005;18(12):1318-1327.

Lehto JT, Halme M, Tukiainen P, Harjula A, Sipponen J, Lautenschlager I. Human herpesvirus-6 and -7 after lung and heart-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(1):41-47.

Leland DS, Hansing RL, French ML. Clinical experience with cytomegalovirus isolation using conventional cell cultures and early antigen detection in centrifugation-enhanced shell vial cultures. *J Clin Microbiol*. 1989;27(6):1159-1162.

Liesnard C, Donner C, Brancart F, Gosselin F, Delforge ML, Rodesch F. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet Gynecol*. 2000;95:881-888.

Limaye AP, Bakthavatsalam R, Kim HW, Kuhr CS, Halldorson JB, Healey PJ, Boeckh M. Late-onset cytomegalovirus disease in liver transplant recipients despite antiviral prophylaxis. *Transplantation*. 2004;15;78(9):1390-1396.

Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*. 2002;34:1094-1097.

Lopez-Contreras J; Ris J; Domingo P; Puig M; Rabella N; Nolla J. Disseminated cytomegalovirus infection in an immunocompetent adult successfully treated with ganciclovir. *Scand J Infect Dis.* 1995;27(5):523-525.

Lopo S, Palminha P, Pité M, Caçador T, Vinagre E, Pereira MA, Paixão MT, Brito MJ, Garrote JM, Carreiro H, Machado MC. "Infecção Congénita pelo vírus citomegálico - Resultados preliminares de estudo prospectivo". *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, Out-Dez 2004: 14-17.

Lopo S, Vinagre E, Palminha P "Vírus Citomegalo", Avaliação do programa nacional de vacinação. 2º Inquérito serológico nacional - Portugal Continental, 2001-2002. Lisboa:DGS, 2004.

Lumbreras C, Fernandez I, Velosa J, Munn SR, Paya C. High incidence of CMV infection following pancreas transplantation. Multidisciplinary approach to understanding cytomegalovirus disease. 1993:165-167. In S. Michelson and S.A. Plotkin (ed.), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands.

Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;34:1094-1097.

Macé M, Sissoeff L, Rudent A, Grangeot-Keros L. A serological testing algorithm for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *Prenat Diagn.* 2004;24(11):861-863.

Maine GT, Lazzarotto T, Landini MP. New developments in the diagnosis of maternal and congenital CMV infection. *Expert Rev Mol Diagn.* 2001;1(1):19-29.

Malm G, Engman ML. Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2007;12(3):154-9.

Manegold C; Alwazze M; Jablonowski H; Adams O; Medve M; Seidlitz B; Heidland U; Haussinger D; Strauer BE; Heintzen MP. Prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after percutaneous transluminal coronary balloon angioplasty. *Circulation.* 1999 ;99(10):1290-1294.

Manez R, Breinig MC, Linden P, Wilson J, Torre-Cisneros J, Kusne S, Dummer S, Ho M. Posttransplant lymphoproliferative disease in primary Epstein-Barr virus infection after liver transplantation: the role of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis.* 1997;176(6):1462-1467.

McCutchan JA. Clinical impact of cytomegalovirus infections of the nervous system in patients with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1995;21 Suppl 2:S196-201.

McDonald GB, Sharma P, Hackman RC, Meyers JD, Thomas ED. Esophageal infections in immunosuppressed patients after marrow transplantation. *Gastroenterology.* 1985; 88:1111-1117.

Medearis DN. Observations concerning human cytomegalovirus infection and disease. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1964;114:181-211.

Melo e Silva F. Estudo comparativo entre a antigenémia e uma técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico e monitorização das infeções pelo vírus citomegálico humano em doentes transplantados. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica, 2º Mestrado em Microbiologia Médica da Universidade Nova de Lisboa, 2009.

Mendez JC, Dockrell DH, Espy MJ, Smith TF, Wilson JA, Harmsen WS, Ilstrup D, Paya CV. Human beta-herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis.* 2001;183(2):179-184.

Mengoli C, Cusinato R, Biasolo MA, Cesaro S, Parolin C, Palu G. Assessment of CMV load in solid organ transplant recipients by pp65 antigenemia and real-time quantitative DNA PCR assay: correlation with pp67 RNA detection. *J Med Virol.* 2004;74(1):78-84.

Meyer-Koenig U, Weidmann M, Kirste G, Hufert FT. Cytomegalovirus infection in organ-transplant recipients: diagnostic value of pp65 antigen test, qualitative polymerase chain reaction (PCR) and quantitative Taqman PCR. *Transplantation.* 2004 15;77(11):1692-1698.

Middeldorp J, Sillekens P, Lunenberg J. Diagnosis of active HCMV infection: the mRNA approach. *Organs and tissues.* 2000; 2:99-107.

Miller E, Cradock-Watson JE, Pollock TM. Consequences of confirmed maternal rubella at successive stages of pregnancy. *Lancet.* 1982; 2(8302):781-784.

Mocroft A, Katlama C, Johnson AM, Pradier C, Antunes F, Mulcahy F, Chiesi A, Phillips AN, Kirk O, Lundgren JD. AIDS across Europe, 1994-98: the EuroSIDA study. *Lancet.* 2000; 356(9226):291-296.

Morton C, Nance W. Newborn Hearing Screening – a Silent Revolution. *N Engl J Med.* 2006; 354: 2151-2164.

Murray PR. Medical microbiology, 5th Edition, 2005. Philadelphia, Elsevier/Mosby.

Naessens A, Casteels A, Decatte L, Foulon W. A serologic strategy for detecting neonates at risk for congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 2005;146(2):194-197.

Narvios AB, Lichtiger B. Bedside leukoreduction of cellular blood components in preventing cytomegalovirus transmission in allogeneic bone marrow transplant recipients: a retrospective study. *Haematologica.* 2001;86(7):749-752.

Ng P, McCluskey P, McCaughan G, Glanville A, MacDonald P, Keogh A. Ocular complications of heart, lung, and liver transplantation *Br J Ophthalmol.* 1998;82:423-428.

Nguyen Q, Champlin R, Giral S, Rolston K, Raad I, Jacobson K, Ippoliti C, Hecht D, Tarrand J, Luna M, Whimbey E. Late cytomegalovirus pneumonia in adult allogeneic blood and marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 1999; 28(3):618-623.

Nichols WG, Boeckh M. Recent advances in the therapy and prevention of CMV infections. *J Clin Virol.* 2000;16(1):25-40.

Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM; Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 2005; 29;353(13):1350-1362.

Noyola DE, Demmler GJ, Williamson WD, Griesser C, Sellers S, Llorente A, Littman T, Williams S, Jarrett L, Yow MD. Cytomegalovirus urinary excretion and long term outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. Congenital CMV Longitudinal Study Group. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19(6):505-510.

Nozawa N, Koyano S, Yamamoto Y, Inami Y, Kurane I, Inoue N. Real-time PCR assay using specimens on filter disks as a template for detection of cytomegalovirus in urine. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1305-1307.

Numazaki Y, Yano N, Morizuka T, Takai S, Ishida N. Primary infection with human cytomegalovirus: virus isolation from healthy infants and pregnant women. *Am J Epidemiol.* 1970; 91:410–417.

Ogilvie M. Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Rev Med Virol.* 2001;11(6):351-354.

Onuigbo M, Haririan A, Ramos E, Klassen D, Wali R, Drachenberg C. Cytomegalovirus-induced glomerular vasculopathy in renal allografts: a report of two cases. *Am J Transplant.* 2002;2(7):684-688.

Osman HK, Peiris JS, Taylor CE, Warwicker P, Jarrett RF, Madeley CR. "Cytomegalovirus disease" in renal allograft recipients: is human herpesvirus 7 a co-factor for disease progression? *J Med Virol.* 1996;48(4):295-301.

O'Sullivan CE, Drew WL, McMullen DJ, Miner R, Lee JY, Kaslow RA, Lazar JG, Saag MS. Decrease of cytomegalovirus replication in human immunodeficiency virus infected-patients after treatment with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 1999;180(3):847-849.

Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998;338(13):853-860.

Paixão P, Toscano C, Baptista Fernandes T, Silva E, Rodrigues R, Boas C, Sarmento P, Lacerda A, Gaspar G, Pinto M, Ferreira L, Ramada D, Carreira H, Marques M, Liesnard C, Marques T. "Prenatal diagnosis of congenital HCMV infection: Western Blot assay can reduce the need for amniocentesis". Abstracts book - "Progress in clinical virology IV - European Society for Clinical Virology". Hamburg, 1998.

Paixão P, Cardoso E, Toscano C, Lopes A, Faro-Viana J, Marques T. "Estudo da avidéz das IgG para o vírus citomegálico humano" *Progresos en Diagnóstico Prenatal*, 2002; 14(2):60-65.

Paixão P, Almeida S, Gouveia P, Toscano C, Dias J, Nogueira C, Pereira C, Vilarinho L, Marques T. "Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in dried blood spots: a comparison of two PCR techniques". Comunicação apresentada sob a forma de poster no "Joint Meeting of the Sociedade Portuguesa de Virologia and the European Society for Clinical Virology". Estoril, 2003.

Paixão P, Almeida S, Gouveia P, Binda S, Caroppo S, Barbi M. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools. *J Virol Methods.* 2005;128(1-2):1-5.

Paixão P, Almeida S, Gouveia P, Toscano C, Piedade J, Baptista Fernandes T, Cardoso E, Dias J, Martins L, Lacerda A, Cunha A, Lima L, Galhano E, Jardim F, Marques T. "Diagnóstico laboratorial pré-natal da infecção congénita por cytomegalovirus: revisão da experiência de 10 anos". *Progresos en Diagnostico y Tratamiento Prenatal*, 2006, 2: 58-63.

Pancholi P, Wu F, Della-Latta P. Rapid detection of cytomegalovirus infection in transplant patients. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004;4(2):231-242.



Pannuti CS; Vilas Boas LS; Angelo MJ; Amato Neto V; Levi GC; de Mendonca JS; de Godoy CV. Cytomegalovirus mononucleosis in children and adults: differences in clinical presentation. *Scand J Infect Dis.* 1985;17(2):153-156.

Pass RF, Stagno S, Myers GJ, Alford CA. Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow-up. *Pediatrics.* 1980;66(5):758-762.

Pass RF, Hutto C, Ricks R, Cloud GA. Increased rate of cytomegalovirus infection among parents of children attending day-care centers. *N Engl J Med.* 1986;314(22):1414-1418.

Pass RF, Little EA, Stagno S, Britt WJ, Alford CA. Young children as a probable source of maternal and congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 1987;316(22):1366-1370.

Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Stagno S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol.* 2006;35:216-220.

Patel R, Smith TF, Espy M, Portela D, Wiesner RH, Krom RA, Paya CV. A prospective comparison of molecular diagnostic techniques for the early detection of cytomegalovirus in liver transplant recipients. *J Infect Dis.* 1995;171(4):1010-1014.

Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(1):86-124.

Paya CV, Wiesner RH, Hermans PE, Larson-Keller JJ, Ilstrup DM, Krom RA, Rettke S, Smith TF. Risk factors for cytomegalovirus and severe bacterial infections following liver transplantation: a prospective multivariate time-dependent analysis. *J Hepatol.* 1993;18(2):185-195.

Percivalle E, Revello MG, Vago L, Morini F, Gerna G. Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J Clin Invest.* 1993;92(2):663-670.

Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, Landini MP. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev Med Virol.* 2004;14(6):383-410.

Ponticelli C, Passerini P. Gastrointestinal complications in renal transplant recipients. *Transpl Int.* 2005;18(6):643-650.

Prosch S, Schielke E, Reip A, Meisel H, Volk H, Einhaupl K, Kruger D. Human Cytomegalovirus (HCMV) Encephalitis in an Immunocompetent Young Person and Diagnostic Reliability of HCMV DNA PCR Using Cerebrospinal Fluid of Nonimmunosuppressed Patients. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:3636-3640.

Puius YA, Snyderman DR. Prophylaxis and treatment of cytomegalovirus disease in recipients of solid organ transplants: current approach and future challenges. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20(4):419-424.

Rabadão E, Duque V, Melo-Silvestre A. The treatment of cytomegalovirus retinitis in human immunodeficiency virus infection. *Acta Med Port.* 1999;12(4-6):203-207.

Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Varbobitis IC, Falagas ME. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virol J.* 2008;5:47.

Rayes N, Seehofer D, Lullius SG, Stein A, May G, Kahl A, Frei U, Neuhaus P, Meisel H. Monitoring of human cytomegalovirus, HHV-6 and HHV-7 infection in kidney transplant recipients by molecular methods to predict HCMV disease after transplantation: a prospective study. *Ann Transplant.* 2005;10(2):23-28.

Razonable RR, Paya CV. Herpesvirus infections in transplant recipients: current challenges in the clinical management of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *Herpes.* 2003;10(3):60-65.

Reszka E, Jegier B, Wasowicz W, Lelonek M, Banach M, Jaszewski R. Detection of infectious agents by polymerase chain reaction in human aortic wall. *Cardiovasc Pathol.* 2008;17(5):297-302.

Reyes J, Abu-Elmagd K, Tzakis A, Nour B, Casavilla A, Kusne S, Green M, Alessiani M, Jain A, Fung JJ, Todo S, Starzl TE. Infectious complications after human small bowel transplantation. *Transplant. Proc.* 1992; 24:1249-1250.

Reynolds DW, Stagno S, Hosty TS, Tiller M, Alford CA Jr. Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N Engl J Med.* 1973; 289:1-5.

Revello MG, Zavattoni M, Sarasini A, Percivalle E, Simoncini L, Gerna G. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. *J Infect Dis.* 1998;177(5):1170-1175.

Revello MG, Zavattoni M, Baldanti F, Sarasini A, Paolucci S, Gerna G. Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of congenitally infected newborns. *J Clin Virol.* 1999;14(1):57-66.

Revello M, Gerna G. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol.* 2004; 29:71-83.

Rifkind D. Cytomegalovirus infection after renal transplantation. *Arch Intern Med.* 1965;116(4):554-558.

Rifkind D, Starzl T, Marchioro TL, Waddell WR, Rowlands DT Jr, Hill RB Jr. Transplantation pneumonia. *JAMA.* 1964;189:808-812.

Rifkind D, Goodman N, Hill RB Jr. The clinical significance of cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Ann Intern Med.* 1967;66(6):1116-1128.

Riley HD Jr. History of the cytomegalovirus. *South Med J.* 1997;90(2):184-190.

Roback JD. CMV and blood transfusions. *Rev Med Virol.* 2002;12(4):211-9.

Ross SA, Fowler KB, Ashrith G, Stagno S, Britt WJ, Pass RF, Boppana SB. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J Pediatr.* 2006;148(3):332-336.

Rowe WP, Hartley JW, Waterman S, Turner HC, Huebner RJ. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956; 92:418-424.

Rubin RH. The indirect Effects of Cytomegalovirus Infection on the Outcome of Organ Transplantation. *JAMA*. 1989, 261: 3607-3609.

Rubin RH. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev Infect Dis*. 1990;12 Suppl 7:S754-766.

Sabin CA, Devereux HL, Clewley G, Emery VC, Phillips AN, Loveday C, Lee CA, Griffiths PD. Cytomegalovirus seropositivity and human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in individuals with hemophilia. *J Infect Dis*. 2000;181(5):1800-1803.

Sacks SL, Freeman HJ. Cytomegalovirus hepatitis: evidence for direct hepatic viral infection using monoclonal antibodies. *Gastroenterology*. 1984;86(2):346-350.

Sagedal S, Hartmann A, Rollag H. The impact of early cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11:518-530.

Salmon-Céron D, Mazon MC, Chaput S, Boukli N, Senechal B, Houhou N, Katlama C, Matheron S, Fillet AM, Gozlan J, Leport C, Jeantils V, Freymuth F, Costagliola D. Plasma cytomegalovirus DNA, pp65 antigenaemia and a low CD4 cell count remain risk factors for cytomegalovirus disease in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2000;14(8):1041-1049.

Sarmiento JM, Dockrell DH, Schwab TR, Munn SR, Paya CV Sarmiento JM, Dockrell DH, Schwab TR, Munn SR, Paya CV. Mycophenolate mofetil increases cytomegalovirus invasive organ disease in renal transplant patients. *Clin Transplant*. 2000; 14: 136–138.

Sato H, Kamoi K, Saeki T, Yamazaki H, Koike T, Miyamura S, Gejyo F. Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone and thrombocytopenia caused by cytomegalovirus infection in a young immunocompetent woman. *Intern Med*. 2004 Dec;43(12):1177-1182.

Schlesinger Y, Halle D, Eidelman AI, Reich D, Dayan D, Rudensky B, Raveh D, Branski D, Kaplan M, Shefer V, Miron D. Urine polymerase chain reaction as a screening tool for the detection of congenital cytomegalovirus infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, 2003; 88(5):371-374.

Schlesinger Y, Reich D, Eidelman AI, Schimmel MS, Hassanin J, Miron D. Congenital cytomegalovirus infection in Israel: screening in different subpopulations. *Isr Med Assoc J*, 2005;7(4):237-240.

Schvoerer E, Henriot S, Zachary P, Freitag R, Fuchs A, Fritsch S, Risch S, Meyer N, Caillard S, Lioure B, Stoll-Keller F. Monitoring low cytomegalovirus viremia in transplanted patients by a real-time PCR on plasma. *J Med Virol*. 2005;76(1):76-81.

Shahinian VB, Muirhead N, Jevnikar AM, Leckie SH, Khakhar AK, Luke PP, Rizkalla KS, Hollomby DJ, House AA. Epstein-Barr virus seronegativity is a risk factor for late-onset posttransplant lymphoproliferative disorder in adult renal allograft recipients. *Transplantation*. 2003;75(6):851-856.

Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*. 1988;158(6):1185-1192.

Siegal DS; Hamid N; Cunha BA Cytomegalovirus colitis mimicking ischemic colitis in an immunocompetent host. *Heart Lung*. 2005;34(4):291-294.

Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ transplantation recipients: New challenges and their implications for preventive strategies. *J Clin Virol*. 2006; 35:474-477.

Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol*. 1995;76:741-750.

Smith TF, Espy MJ, Mandrekar J, Jones MF, Cockerill FR, Patel R. Quantitative real-time polymerase chain reaction for evaluating DNAemia due to cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and BK virus in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2007;45(8):1056-1061.

Sobral J. Optimização do procedimento de quantificação da carga viral do Citomegalovírus por PCR em Tempo Real. Relatório de Estágio do Curso de Engenharia Biotecnológica, Universidade do Algarve, Centro de Histocompatibilidade do Sul – Lusotransplante. 2005.

Söderberg C, Larsson S, Bergstedt-Lindqvist S, Möller E. Identification of blood mononuclear cells permissive of cytomegalovirus infection in vitro. *Transplant Proc*. 1993;25:1416-1418.

Sorlie PD; Nieto FJ; Adam E; Folsom AR; Shahar E; Massing M. A prospective study of cytomegalovirus, herpes simplex virus 1, and coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Arch Intern Med*. 2000.;160(13):2027-2032.

Sousa F, Melo A, Almeida S, Paixão P, Queiroz JA, Domingues FC. Isolation of a fusion protein containing the antigenic domain 1 of human cytomegalovirus glycoprotein B and its application in ELISA tests. *Biotechnol Lett*. 2006;28(2):73-77.

Spector SA, Hsia K, Crager M, Pilcher M, Cabral S, Stempien MJ. Cytomegalovirus (CMV) DNA load is an independent predictor of CMV disease and survival in advanced AIDS. *J Virol*. 1999;73(8):7027-7030.

Squifflet JP, Legendre C. The economic value of valacyclovir prophylaxis in transplantation. *J Infect Dis*. 2002;186 Suppl 1:S116-122.

Squizzato A, Ageno W, Cattaneo A, Brumana N. A Case Report and Literature Review of Portal Vein Thrombosis Associated with Cytomegalovirus Infection in Immunocompetent Patients *Clin Infect Dis*. 2007;44:e13-e16

Stagno S, Reynolds DW, Tsiantos A, Fuccillo DA, Long W, Alford CA. Comparative serial virologic and serologic studies of symptomatic and subclinical congenitally and natally acquired cytomegalovirus infections. *J Infect Dis*. 1975;132(5):568-577.

Stagno S, Reynolds DW, Amos CS, Dahle AJ, McCollister FP, Mohindra I, Ermocilla R, Alford CA. Auditory and visual defects resulting from symptomatic and subclinical congenital cytomegalovirus and toxoplasma infections. *Pediatrics*, 1977; 59:669-678.

Stagno S, Reynolds DW, Pass RF, Alford CA Jr. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med*. 1980; 302:1073-1074.

Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Henderson RE, Moore EG, Walton PD, Alford CA. Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N Engl J Med*. 1982, 22;306(16):945-949.

Staras SA, Flanders WD, Dollard SC, Pass RF, McGowan JE Jr, Cannon MJ. Influence of sexual activity on cytomegalovirus seroprevalence in the United States, 1988-1994. *Sex Transm Dis*. 2008;35(5):472-479.

Steininger C; Popow-Kraupp T; Seiser A; Gueler N; Stanek G; Puchhammer E. Presence of cytomegalovirus in cerebrospinal fluid of patients with Guillain-Barre syndrome. *J Infect Dis*. 2004;189(6):984-9.

Steininger C, Kundi M, Kletzmayr J, Aberle SW, Popow-Kraupp T. Antibody maturation and viremia after primary cytomegalovirus infection, in immunocompetent patients and kidney-transplant patients. *J Infect Dis*. 2004, 1;190(11):1908-1912.

Steininger C, Puchhammer-Stockl E, Popow-Kraupp T. Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Clin Virol*. 2006;37(1):1-9.

Stephan F, Meharzi D, Ricci S, Fajac A, Clergue F, Bernaudin JF. Evaluation by polymerase chain reaction of cytomegalovirus reactivation in intensive care patients under mechanical ventilation. *Intensive Care Med*. 1996;22:1244-1249.

Szer J, Durrant S, Schwarzer AP, Bradstock KF, Gibson J, Arthur C, To LB, Hughes T, Raunow H. Oral versus intravenous ganciclovir for the prophylaxis of cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Intern Med J*. 2004;34(3):98-101.

Taniwaki S; Kataoka M; Tanaka H; Mizuno Y; Hirose M. Multiple ulcers of the ileum due to Cytomegalovirus infection in a patient who showed no evidence of an immunocompromised state. *J Gastroenterol*. 1997;32(4):548-552.

Tegtmeier GE. Posttransfusion cytomegalovirus infections. *Arch Pathol Lab Med*. 1989;113(3):236-245.

Tendero DT. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus (CMV) infections in immunodepressed patients, mainly in patients with AIDS. *Clin Lab*. 2001;47(3-4):169-83.

The TH, van der Bij W, van den Berg AP, van der Giessen M, Weits J, Sprenger HG, van Son WJ. Cytomegalovirus antigenemia. *Rev Infect Dis*. 1990;12 Suppl 7:S734-744.

The TH, van den Berg AP, Harmsen MC, van der Bij W, van Son WJ. The cytomegalovirus antigenemia assay: a plea for standardization. *Scand J Infect Dis. Suppl*. 1995;99:25-29.

Timóteo A, Ferreira J, Paixão P, Aguiar C, Teles R, Cardoso E, Silva JA, Marques T, Seabra-Gomes R. Serologic markers for cytomegalovirus in acute coronary syndromes. *Rev Port Cardiol*. 2003;22(5):619-631.

Tong CY, Bakran A, Williams H, Cheung CY, Peiris JS. Association of human herpesvirus 7 with cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2000;70(1):213-216.

Tyler KL; Gross RA; Cascino GD. Unusual viral causes of transverse myelitis: hepatitis A virus and cytomegalovirus. *Neurology*. 1986;36(6):855-858.

Vauloup-Fellous C, Ducroux A, Couloigner V, Marlin S, Picone O, Galimand J, Loundon N, Denoyelle F, Grangeot-Keros L, Leruez-Ville M. Evaluation of cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in dried blood spots: retrospective study of CMV congenital infection. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(11):3804-3806.

Vamvakas EC. Is white blood cell reduction equivalent to antibody screening in preventing transmission of cytomegalovirus by transfusion? A review of the literature and meta-analysis. *Transfus Med Rev.* 2005;19(3):181-199.

van der Bij W, van Dijk RB, van Son WJ, Torensma R, Prenger KB, Prop J, Tegzess AM, The TH. Antigen test for early diagnosis of active cytomegalovirus infection in heart transplant recipients. *J Heart Transplant.* 1988;7(2):106-109.

van Son WJ; The TH. Cytomegalovirus infection after organ transplantation: an update with special emphasis on renal transplantation. *Transplant Intern,* 1989; 2:147-164.

Veldhuis W, Janssen M, Kortlandt W, van Houte A, van de Ree M. . Coombs-negative severe haemolytic anaemia in an immunocompetent adult following cytomegalovirus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004, 23(11):844-847.

Verkruyse LA, Storch GA, Devine SM, Dipersio JF, Vij R. Once daily ganciclovir as initial pre-emptive therapy delayed until threshold CMV load > or =10000 copies/ml: a safe and effective strategy for allogeneic stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(1):51-56.

Villar LA; Massanari RM; Mitros FA. Cytomegalovirus infection with acute erosive esophagitis. *Am J Med.* 1984;76(5):924-928.

Visser LH; van der Meche FG; Meulstee J; Rothbarth PP; Jacobs BC; Schmitz PI; van Doorn PA. Cytomegalovirus infection and Guillain-Barre syndrome: the clinical, electrophysiologic, and prognostic features. Dutch Guillain-Barre Study Group. *Neurology.* 1996;47(3):668-673.

Vlieger AM, Boland GJ, Jiwa NM, de Weger RA, Willemze R, de Gast GC, Falkenburg JH. Cytomegalovirus antigenemia assay or PCR can be used to monitor ganciclovir treatment in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 1992;9(4):247-253.

Volin L, Lautenschlager I, Juvonen E, Nihtinen A, Anttila VJ, Ruutu T. Human herpesvirus 6 antigenaemia in allogeneic stem cell transplant recipients: impact on clinical course and association with other beta-herpesviruses. *Br J Haematol.* 2004;126(5):690-696.

von Müller L, Klemm A, Weiss M, Schneider M, Suger-Wiedeck H, Durmus N, Hampl W, Mertens T. Active Cytomegalovirus Infection in Patients with Septic Shock. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(10):1517-1522.

von Müller L, Hinz J, Bommer M, Hampl W, Kluwick S, Wiedmann M, Bunjes D, Mertens T. CMV monitoring using blood cells and plasma: a comparison of apples with oranges? *Bone Marrow Transplant.* 2007;39(6):353-357.

Wakefield A, Fox J, Sawyerr A, Taylor J, Sweeney C, Smith M, Emery V, Hudson M, Tedder R, Pounder R. Detection of Herpesvirus DNA in the Large Intestine of Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Using the Nested Polymerase Chain Reaction. *J Med Virol,* 1992; 38:183-190.

Walmsley S, O'Rourke K, Mortimer C, Rachlis A, Fong I, Mazzulli T. Predictive value of cytomegalovirus (CMV) antigenemia and digene hybrid capture DNA assays for CMV disease in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis*. 1998;27(3):573-581.

Walter S, Atkinson C, Sharland M, Rice P, Raglan E, Emery VC, Griffiths PD. Congenital cytomegalovirus: Association between dried blood spot viral load and hearing loss. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2008;93(4):280-285.

Wang JY, Chang YL, Lee LN, Chen JH, Tang JL, Yang PC, Lee YC. Diffuse pulmonary infiltrates after bone marrow transplantation: the role of open lung biopsy. *Ann Thorac Surg*. 2004; 78(1):267-272.

Watson C, Alp NJ. Role of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *Clin Sci*. 2008;114(8):509-531.

Weber B, Prosser F, Munkwitz A, Doerr HW. "Serological diagnosis of cytomegalovirus infection: comparison of 8 enzyme immunoassays for the detection of HCMV-specific IgM antibody". *Clin Diagn Virol*, 1994; 2. 245-259.

Winston DJ, Huang ES, Miller MJ, Lin CH, Ho WG, Gale RP, Champlin RE. Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections associated with bone marrow transplantation. *Ann Intern Med*. 1985;102(1):16-20.

Winston DJ, Yeager AM, Chandrasekar PH, Snyderman DR, Petersen FB, Territo MC; Valacyclovir Cytomegalovirus Study Group. Randomized comparison of oral valacyclovir and intravenous ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis*. 2003;36(6):749-758.

Wohl DA, Zeng D, Stewart P, Glomb N, Alcorn T, Jones S, Handy J, Fiscus S, Weinberg A, Gowda D, van der Horst C. Cytomegalovirus viremia, mortality, and end-organ disease among patients with AIDS receiving potent antiretroviral therapies. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005; 15;38(5):538-544.

Wreghitt TG, Teare EL, Sule O, Devi R, Rice P.. Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis*. 2003; 37(12): 1603-1606.

Yasuda A, Kimura H, Hayakawa M, Ohshiro M, Kato Y, Matsuura O, Suzuki C, Morishima T. Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatrics*. 2003;111:1333-1336.

Yen KT, Lee AS, Krowka MJ, Burger CD. Pulmonary complications in bone marrow transplantation: a practical approach to diagnosis and treatment. *Clin Chest Med*. 2004; 25(1):189-201.

Yoshikawa T. Human herpesvirus-6 and -7 infections in transplantation. *Pediatr Transplant*. 2003;7(1):11-17.

Yow M. Congenital Cytomegalovirus Disease: a NOW problem. *J Infect Dis*. 1989; 2:163-167.

Yust I, Fox Z, Burke M, Johnson A, Turner D, Mocroft A, Katlama C, Ledergerber B, Reiss P, Kirk O; EuroSIDA. Retinal and extraocular cytomegalovirus end-organ disease in HIV-infected patients in Europe: a EuroSIDA study, 1994-2001. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(7):550-559.

Zhou YF; Leon MB; Waclawiw MA; Popma JJ; Yu ZX; Finkel T; Epstein SE. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. N Engl J Med 1996;335(9):624-630.

Zuckerman A, Banatvala J, Pattison J, Griffiths PD, Schoub BD, editores. Principles and Practice of Clinical Virology. 5th Edition, 2004. West Sussex, John Wiley and Sons, Ltd.